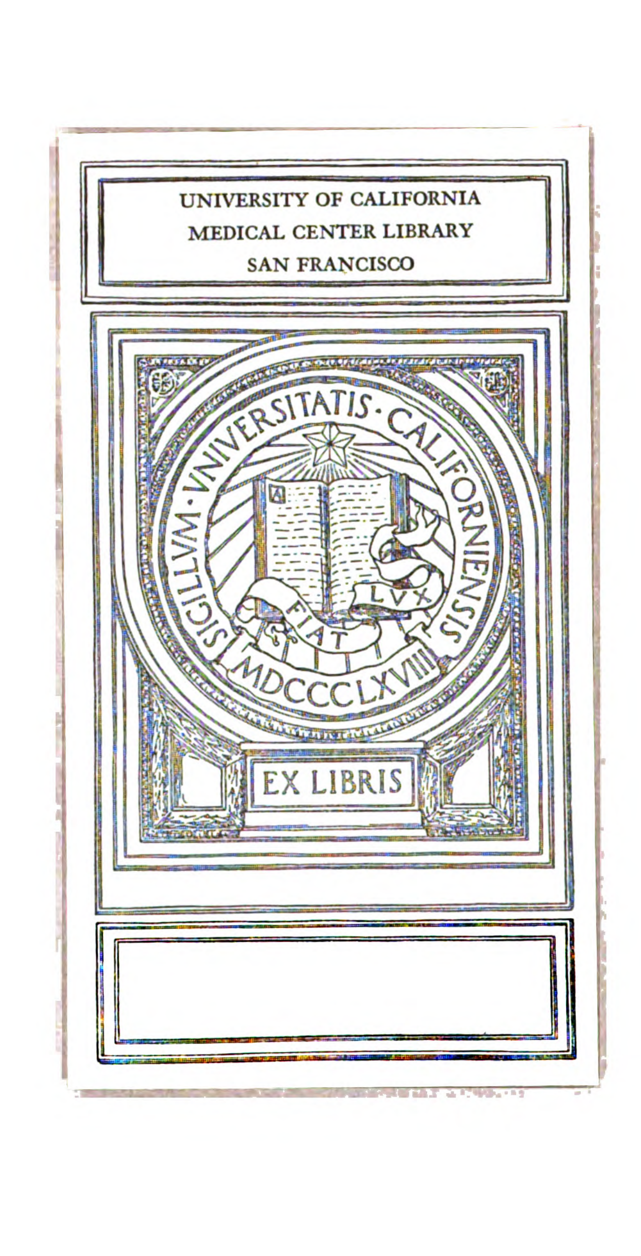
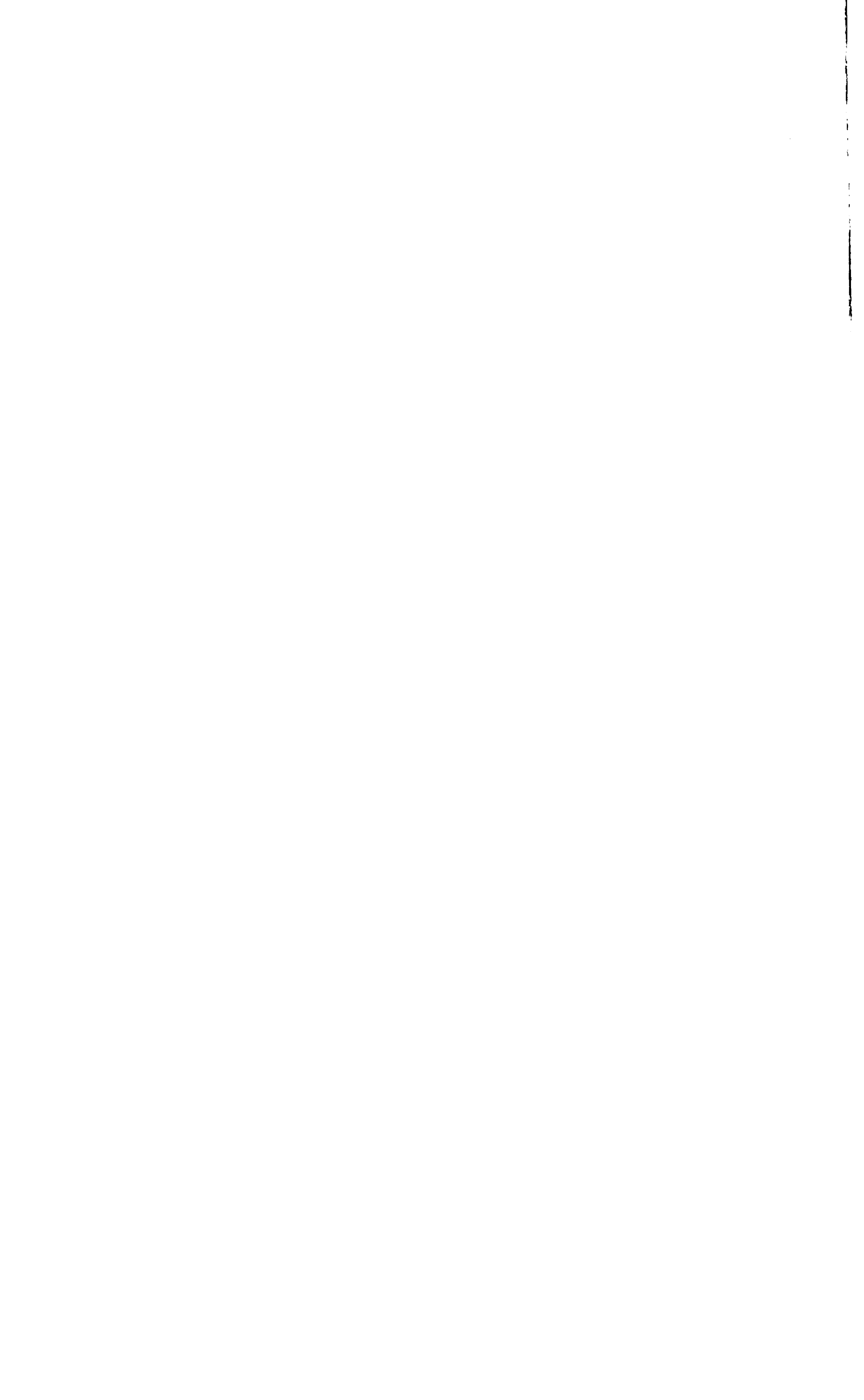
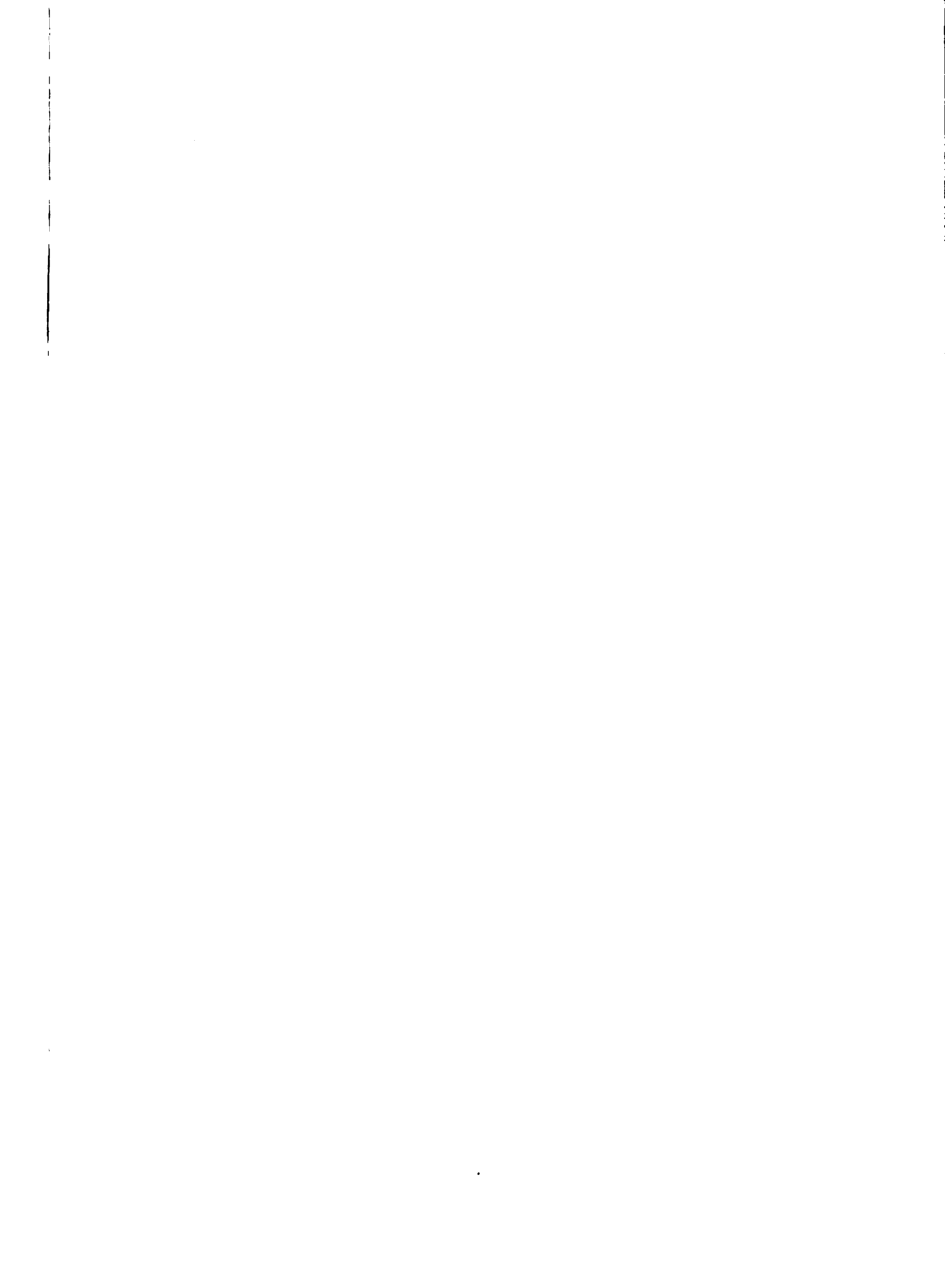


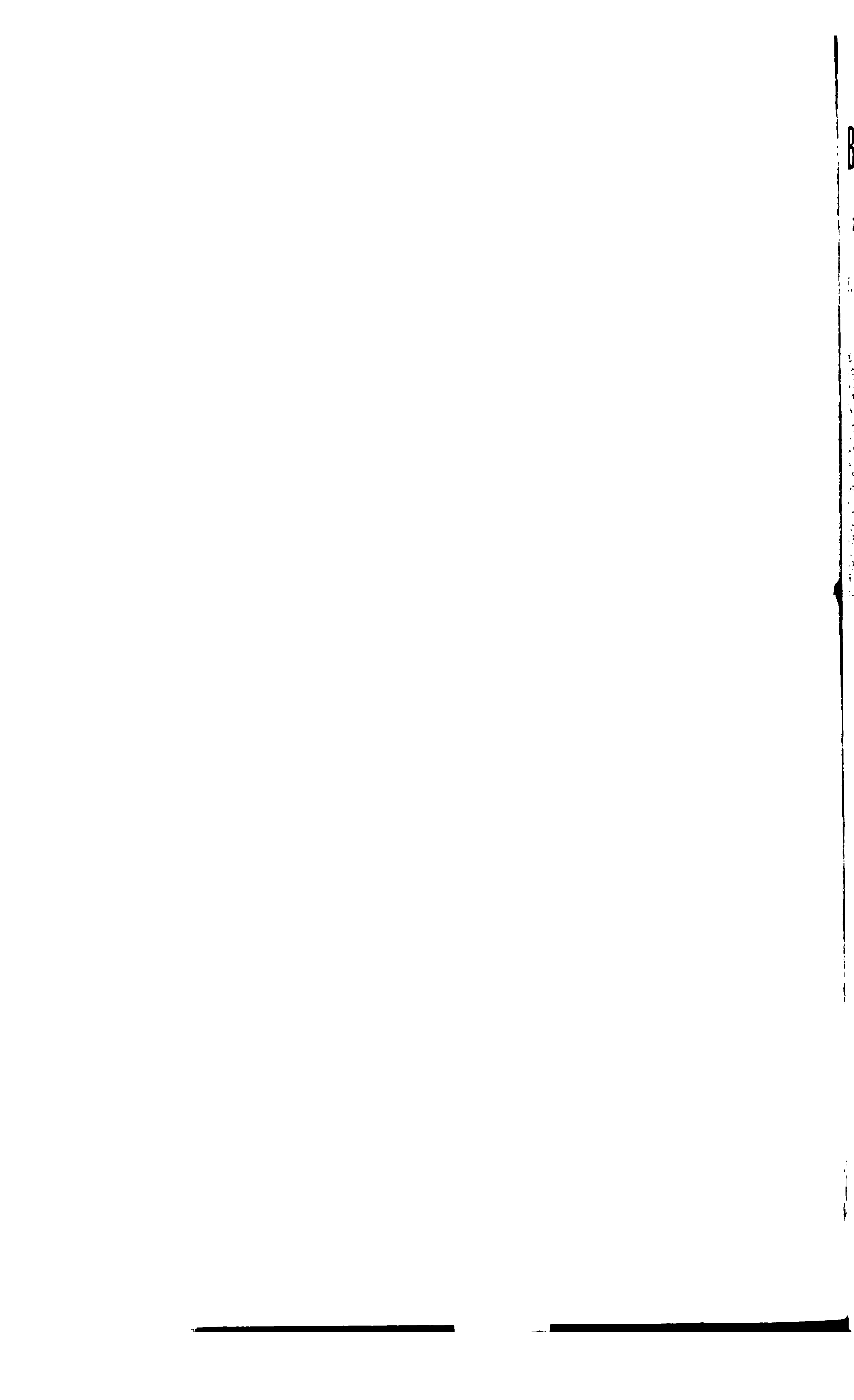


UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS









Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

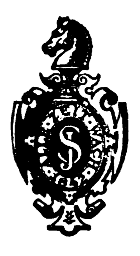
F. Hofmeister-Würzburg, **C. von Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **A. von Wassermann**-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundsechzehnter Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1921

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Biochemische Zeitschrift

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie

Herausgegeben von

F. Hofmeister-Würzburg, C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, A. von Wassermann-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **F. Czapek**-Leipzig, **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **H. v. Euler**-Stockholm, **J. Feigl**-Hamburg, **S. Flexner**-New York, **J. Forssman**-Lund, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **H. Freundlich**-Berlin-Dahlem, **E. Friedberger**-Greifswald, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **F. Haber**-Berlin-Dahlem, **H. J. Hamburger**-Groningen, **P. Hári**-Budapest, **E. Hägglund**-Åbo, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **V. Henriques**-Kopenhagen, **R. O. Herzog**-Berlin-Dahlem, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **A. Koch**-Göttingen, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Greifswald, **L. Michaelis**-Berlin, **H. Molisch**-Wien, **J. Morgenroth**-Berlin, **E. Münzer**-Prag, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **J. K. Parnas**-Lemberg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **P. Rona**-Berlin, **H. Sachs**-Heidelberg, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **T. Sasaki**-Tokio, **A. Scheunert**-Berlin, **A. Schloßmann**-Düsseldorf, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Liestal, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **K. Suto**-Kanazawa, **H. v. Tappeiner**-München, **K. Thomas**-Leipzig, **H. Thoms**-Berlin, **P. Trendelenburg**-Rostock, **O. Warburg**-Berlin, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin

Hundertundsechzehnter Band

Erstes bis sechstes Heft

Ausgegeben am 2. Mai 1921



Berlin

Verlag von Julius Springer

1921

116. Band. **Inhaltsverzeichnis.** 1./6. Heft

Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses siehe III. Umschlagseite!

Über die Bildung von d-Milchsäure im tierischen Organismus.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Hinsichtlich der Herkunft und der Bedeutung der d-Milchsäure liegen mehrfache Angaben vor.

Gaglio[1]), der eine Milchsäurebildung bei Durchblutungsversuchen durch überlebende Nieren und Lungen konstatierte, fand im Blute von Hunden nach Eiweißnahrung 0,3—0,5 p. m. Milchsäure, nach 48stündigem Fasten dagegen nur 0,17—0,21 p. m. Nach Minkowski[2]) steigt bei entleberten Vögeln die im Harne ausgeschiedene Menge Milchsäure mit reichlicherer Eiweißnahrung, während sie von der zugeführten Kohlehydratmenge unabhängig ist. Es sei hier gleich erwähnt, daß es ihm niemals gelang, eine Spur von Traubenzucker im Harne von Vögeln nach der Leberexstirpation aufzufinden. Auf Grund dieser Beobachtungen glaubte er behaupten zu dürfen, daß die Entstehung der d-Milchsäure im Vogelorganismus nichts mit dem Zerfall der Kohlenhydrate zu tun hat, vielmehr das Eiweiß als die Muttersubstanz der d-Milchsäure zu betrachten ist. Im Gegensatz zu dieser Behauptung wurde eine eigenartige Deutung für die Bildung von d-Milchsäure im Tierkörper beim Sauerstoffmangel durch T. Araki[3]) gegeben. Dieser Forscher erzeugte bei Hunden, Kaninchen und Hühnern dadurch Sauerstoffmangel, daß er diese Tiere in einer sauerstoffarmen Atmosphäre atmen ließ oder die Verarmung des Blutes an Sauerstoff durch vorsichtige Vergiftung mit Kohlenoxyd herbeiführte, und fand dabei, daß reichliche Quantitäten von Traubenzucker und d-Milchsäure im Harne ausgeschieden werden. Da nun unter allen Umständen, wo Milchsäure und Zucker im Harne auftraten, stets eine Abnahme des Glykogengehaltes in

---

[1]) Gaglio, Arch. f. Physiol. 1886.

[2]) Minkowski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **21** u. **31**.

[3]) Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie **15**, **16**, **17** u. **19**.

der Leber und den Muskeln erfolgte, so war er der Ansicht, daß die Bildung von Zucker, der im Harne auftritt, aus Glykogen herzuleiten sei und die Bildung von d-Milchsäure wieder aus einer Spaltung des Zuckers. Dann haben Embden und Kraus[1]) angegeben, daß bei Durchströmung von Blut durch eine überlebende, an Glykogen reiche Leber eine Milchsäurebildung stattfindet. Ebenso entstand Milchsäure, wenn man durch eine glykogenfreie Leber zuckerreiches Blut leitete, während dagegen zuckerarmes Blut nur eine sehr unbedeutende Milchsäurebildung bewirkte. Sie haben auch Durchblutungsversuche mit Zusatz der Aminosäure Alanin durchgeführt und gefunden, daß auch dann eine Milchsäurebildung stattfindet. Daß die d-Milchsäure ferner bei der Autolyse der Leber und anderer Organe auftritt, haben Magnus-Levy[2]) und andere Forscher gezeigt. Hinsichtlich des Ursprunges der d-Milchsäure bei der Autolyse sind die Grundlagen jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

Die Ansichten über die Herkunft und die Entstehung der Milchsäure im Tierkörper gehen sehr auseinander. Bei Durchsicht der Milchsäureliteratur war mir vor allem das Fehlen eines klaren und eindeutigen Beweises für die tatsächliche Umwandlung von Traubenzucker zu Milchsäure in dem lebenden Körper aufgefallen. Daß ein Organismus Zucker direkt in Milchsäure überführen kann, ist zwar durch Versuche an isolierten und überlebenden Organen und Organsäften sowie durch die Versuche über Glykolyse im Blute und durch die Analogie mit dem Vorgange der bakteriellen Milchsäuregärung wahrscheinlich geworden. Aber einen klaren Beweis dafür, daß ein solcher Übergang von Zucker in Milchsäure sich im lebenden Körper auch wirklich vollzieht, vermochte ich in der Literatur nicht ausfindig zu machen.

Auf eine Anregung Prof. Arakis zwecks Aufklärung des Ursprunges und der weiteren Umwandlung der Fleischmilchsäure im lebenden Organismus sowie in autolysierten Organen sind die folgenden Untersuchungen unternommen worden.

Isolierte Zellen und vor allem sich entwickelnde Eier bieten ein sehr wertvolles Material für manche Fragestellungen, welche die Umwandlung der einzelnen zur Verfügung stehenden Verbindungen betreffen. Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß die einzelnen Zellen den gleichen Prozessen unterworfen sind, wie die des fertigen Organismus. Die gleichen Probleme, die wir beim erwachsenen Individuum verfolgt haben, können wir auch auf sich entwickelnde Eizellen übertragen; es sind im Prinzip auch

[1]) Embden und Kraus, diese Zeitschr. 45.
[2]) Magnus-Levy, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 261.

die gleichen Methoden, die zu ihrem Studium angewendet werden. Aus diesem Grunde bediente man sich befruchteter Hühnereier als Versuchsmaterial.

Im folgenden sollen nun zunächst die betreffenden Versuche und deren Ergebnisse geschildert werden. Die Besprechung der sich aus ihnen ergebenden Schlüsse wird später im Zusammenhange stattfinden.

Über das Verhalten der im Eierklar sowie im Dotter vorhandenen d-Milchsäure bei Bebrütung von Hühnereiern.

Im hiesigen Institut hat es schon Kinzuchi Anno[1]) sehr wahrscheinlich gemacht, daß d-Milchsäure, wenn auch in sehr geringer Menge, als ein konstanter Bestandteil im Hühnerei enthalten ist. Er hat weiterhin festgestellt, daß bei dreitägiger Bebrütung des Hühnereies reichliche Bildung von d-Milchsäure im Eierklar erfolgt, während unter der gleichen Bedingung sich nur eine geringe Menge von d-Milchsäure im Dotter nachweisen läßt. Es ist im Anschluß an diese Ergebnisse von großem Interesse, nach einer genaueren Methode und durch umfangreichere und zahlreichere Versuche zu erfahren, wie die im Eierklar und im Dotter vorhandene Milchsäure sich bei der Bebrütung der Hühnereier verhält.

Die Bestimmung der d-Milchsäure selbst geschieht folgendermaßen.

Eierklar und Dotter werden sorgsam getrennt und mit einem je 5fachen Volumen Wasser verrührt, sodann in einer emaillierten eisernen Schale unter Herstellung schwach saurer Reaktion durch verdünnte Schwefelsäure so lange im Sieden erhalten, bis das Eiweiß völlig ausgefallen ist, und dann filtriert. Das Eiweißkoagulum wird gründlich mit siedendem Wasser ausgewaschen; die Waschwässer werden mit dem Filtrat vereinigt und zur Entfernung der überschüssigen Schwefelsäure mit Bariumcarbonat versetzt und filtriert. Nachdem man sich überzeugt hat, daß das Filtrat völlig frei von Schwefelsäure ist, wird es unter vermindertem Druck bei einer 50° Badtemperatur eingeengt. Der Rückstand wird mit einem 10fachen Volumen 95 proz. Alkohols vermischt und nach 24stündigem Stehenlassen filtriert. Das Filtrat verdunstet, und der Rückstand mit absolutem Alkohol erschöpft. Von dieser Lösung wird nun der Alkohol abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und zur Entfernung des Fettes 48 Stunden lang im Extraktionsapparat mit reinem Äther extrahiert. Dazu säuert man die fettfreie wässerige Lösung stark mit Phosphorsäure an und

[1]) K. Anno, Zeitschr. f. physiol. Chemie 80, 237.

extrahiert 72 Stunden lang im Extraktionsapparat. Der Ätherauszug wird mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet, filtriert, der Äther abdestilliert, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, eine halbe Stunde auf dem Wasserbad mit Bleicarbonat erhitzt, filtriert und das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt. Man engt dann die von Schwefelblei abfiltrierte Flüssigkeit unter vermindertem Druck bei mäßiger Wärme stark ein, um den gelösten Schwefelwasserstoff zu vertreiben. Die eingeengte Flüssigkeit wird schließlich mit reinem Lithiumcarbonat in Lithiumlactat überführt. Die weitere Behandlung führt man nach Angabe von Junji Yoshikawa[1]) aus und bestimmt die d-Milchsäure. Aus dem beobachteten Drehungswinkel α kann man stets die Konzentration c der betreffenden Lithiumlactatlösung nach folgender Formel berechnen:

$$c = \frac{0{,}2864 - \sqrt{0{,}082025 + 0{,}0162\,\alpha}}{0{,}0081}$$

1. Versuchsreihe.

Ist im unbefruchteten frischen Hühnerei d-Milchsäure enthalten?

Das Eierklar und der Dotter von frischen unbefruchteten Hühnereiern werden jedesmal gesondert auf d-Milchsäure verarbeitet. Die Resultate der einzelnen d-Milchsäurebestimmungen sind aus Tabelle I ersichtlich.

Tabelle I.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eierklars in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactats in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	35	995	2	—	—	—	—	—
2	40	1160	2	—	—	—	—	—
3	50	1590	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0010
4	93	2953	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0005
								0,0007

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactats in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	35	563	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0133
2	40	632	2	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0068
3	50	858	2	−0,11	0,3950	0,0987	0,0925	0,0107
4	93	1643	2	−0,27	0,9629	0,2407	0,2257	0,0137
								0,0111

[1]) J. Yoshikawa, Zeitschr. f. physiol. Chemie 87, 382.

Aus den Versuchsresultaten in Tabelle I geht hervor, daß die d-Milchsäuremenge im Eierklar des unbefruchteten frischen Hühnereies sehr gering ist. Die im Dotter vorhandene d-Milchsäure ist ebenfalls klein und läßt sich zu 0,011% als Mittel angeben.

2. Versuchsreihe.

Ist d-Milchsäuremenge im Eierklar sowie im Dotter des frischen befruchteten Hühnereies vorhanden?

Die Verarbeitung des Eierklars und des Dotters geschieht auf die gleiche Weise wie bei der 1. Versuchsreihe. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eierklars in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	740	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0070
2	30	855	2	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0050
3	71	1991	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0055
								0,0058

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	410	2	−0,12	0,4321	0,1080	0,1013	0,0247
2	30	488	2	−0,25	0,8888	0,2222	0,2084	0,0426
3	71	1125	2	−0,38	1,3580	0,3395	0,3184	0,0283
								0,0318

Aus den Versuchsresultaten der Tabelle II geht hervor, daß die d-Milchsäuremenge im Eierklar sowie im Dotter des frischen befruchteten Eies etwas größer ist als die im unbefruchteten Ei. Der Milchsäurewert im Eierklar schwankt zwischen 0,007% und 0,005% und liefert im Mittel nach drei verschiedenen Bestimmungen den Wert von 0,005%. Der höchste Milchsäurewert im Dotter beträgt 0,0426%, der niedrigste 0,024%. Aus den drei verschiedenen Bestimmungen läßt sich 0,0316% als Mittel berechnen.

3. Versuchsreihe.

Zu den Versuchen fanden 1 Tag bebrütete Hühnereier Verwendung. Die Ergebnisse gehen aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle III.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	30	870	2	−0,25	0,8888	0,2222	0,2084	0,0239
2	25	712	2	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0211
3	35	937	2	−0,27	0,9629	0,2407	0,2257	0,0240
								0,0230

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	30	510	2	−0,54	1,9506	0,4876	0,4573	0,0896
2	25	435	2	−0,29	1,0370	0,2592	0,2431	0,0558
3	35	591	2	−0,41	1,4691	0,3672	0,3444	0,0582
								0,0678

Vergleicht man die in Tabelle III eingetragenen Mittelwerte der d-Milchsäure mit denen der d-Milchsäure in Tabelle II, so läßt sich nicht verkennen, daß die d-Milchsäure im Eierklar sowie im Dotter bei 1tägiger Bebrütung eine bedeutende Zunahme erfährt.

4. Versuchsreihe.

Das Eierklar und der Dotter von 3 Tage lang bebrüteten Hühnereiern wurden nun auf d-Milchsäure verarbeitet. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Resultate.

Tabelle IV.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	19	427	2	−0,19	0,6790	0,1697	0,1591	0,0372
2	22	494	2	−0,25	0,8888	0,2222	0,2084	0,0421
3	15	265	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0414
4	57	1366	2	−0,73	2,6543	0,6635	0,6223	0,0455
								0,0415

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	23	363,8	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0183
2	20	321	2	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0134
3	20	376	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0200
								0,0172

In Tabelle VII bemerkt man bei 10tägiger Bebrütung der Hühnereier eine Abnahme der d-Milchsäure im Eierklar und Dotter. Das Fallen des d-Milchsäuregehaltes erfolgt im Dotter in viel bedeutenderem Maße als im Eierklar.

8. Versuchsreihe.

Zu den folgenden Versuchen wurden 14 Tage bebrütete Hühnereier verwendet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	150	2	−0,03	0,1111	0,0277	0,0259	0,0172
2	18	95,5	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0169
3	20	123	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0131
								0,0157

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	202	2	−0,01	0,1234	0,0308	0,0288	0,0142
2	18	158,7	2	—	—	—	—	—
3	20	181,5	2	—	—	—	—	—
								0,0142

Der Mittelwert der d-Milchsäure im Eierklar beträgt nur 0,0157%. Abgesehen von einem Fall, wo 0,0142% d-Milchsäure im Dotter gefunden wurde, ist die d-Milchsäure im Dotter bis auf Null gesunken.

Es folgt hier nun eine Tabelle, die die in den angeführten Versuchen erhaltenen Mittelwerte für d-Milchsäure im Eierklar und im Dotter veranschaulicht.

6. Versuchsreihe.

Zu Versuchen wurde jedesmal Material verwendet, welches von 7 Tage bebrüteten Hühnereiern herrührte. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle VI zusammengestellt.

Tabelle VI.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	20	202	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0329
2	20	172,4	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0386
3	30	315	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0348
								0,0354

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	20	313	2	−0,41	1,4691	0,3672	0,3444	0,1100
2	20	248	2	−0,25	0,8888	0,2222	0,2084	0,0839
3	30	441	2	−0,48	1,7283	0,4320	0,4007	0,0908
								0,0949

Tabelle VI zeigt im Mittel aus 3 Bestimmungen 0,0354% d-Milchsäure im Eierklar und 0,0949% im Dotter. Es fällt hier sofort auf, daß die d-Milchsäure im Eierklar sowie im Dotter bei 7tägiger Bebrütung eine Abnahme erfährt.

7. Versuchsreihe.

Eierklar und Dotter von 10 Tage lang bebrüteten Hühnereiern werden auf d-Milchsäure verarbeitet. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle VII.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	23	198	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0260
2	20	185	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0278
3	20	239	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0314
								0,0284

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	23	363,8	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0183
2	20	321	2	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0134
3	20	376	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0200
								0,0172

In Tabelle VII bemerkt man bei 10tägiger Bebrütung der Hühnereier eine Abnahme der d-Milchsäure im Eierklar und Dotter. Das Fallen des d-Milchsäuregehaltes erfolgt im Dotter in viel bedeutenderem Maße als im Eierklar.

8. Versuchsreihe.

Zu den folgenden Versuchen wurden 14 Tage bebrütete Hühnereier verwendet. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle VIII zusammengestellt.

Tabelle VIII.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	150	2	−0,03	0,1111	0,0277	0,0259	0,0172
2	18	95,5	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0169
3	20	123	2	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0131
								0,0157

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	C	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	25	202	2	−0,01	0,1234	0,0308	0,0288	0,0142
2	18	158,7	2	—	—	—	—	—
3	20	181,5	2	—	—	—	—	—
								0,0142

Der Mittelwert der d-Milchsäure im Eierklar beträgt nur 0,0157%. Abgesehen von einem Fall, wo 0,0142% d-Milchsäure im Dotter gefunden wurde, ist die d-Milchsäure im Dotter bis auf Null gesunken.

Es folgt hier nun eine Tabelle, die die in den angeführten Versuchen erhaltenen Mittelwerte für d-Milchsäure im Eierklar und im Dotter veranschaulicht.

Tabelle IX.

Bebrütungsdauer	Menge der d-Milchsäure in %		Bemerkungen
	im Eierklar	im Dotter	
	0,0007	0,0111	Bei Verwendung von frischen unbefruchteten Eiern
	0,0058	0,0316	Bei Verwendung von frischen befruchteten Eiern
1 Tag	0,0230	0,0678	
3 Tage	0,0415	0,0790	
5 „	0,0763	0,1337	
7 „	0,0354	0,0947	
10 „	0,0284	0,0172	
14 „	0,0157	0,0142	

Der Übersichtlichkeit halber sind die Resultate im folgenden kurvenmäßig dargestellt.

Im obigen Koordinatensystem sind die Bebrütungszeiten als Abszisse, d-Milchsäuremengen als Ordinate aufgetragen.

Aus den beschriebenen Untersuchungen ergeben sich folgende Schlüsse:

1. Der Gehalt des Hühnereies an d-Milchsäure ist sehr gering und beträgt im Eierklar 0,0058% und im Dotter 0,0111%. Die Milchsäuremenge des unbefruchteten Eies ist geringer als die des befruchteten.

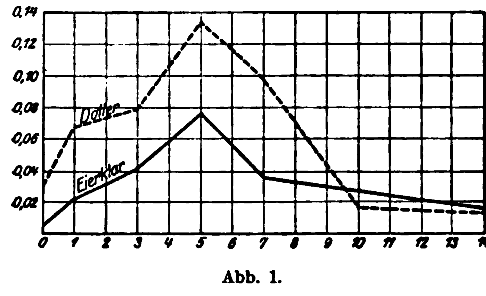


Abb. 1.

2. Bei der Bebrütung nimmt der d-Milchsäuregehalt des Eierklars allmählich zu; unter gleichen Bedingungen erfolgt die Zunahme der d-Milchsäure im Dotter in viel bedeutenderem Maße.

3. Bei 5tägiger Bebrütung erreicht der d-Milchsäuregehalt des Eierklars und Dotters seinen Höhepunkt. Bei weiterer Bebrütung erfolgt eine Abnahme von d-Milchsäure im Eierklar und im Dotter, und bei 14tägiger Bebrütung sinkt der d-Milchsäuregehalt auf eine geringfügige Menge.

Es ist bereits bekannt, daß Gozo Sato[1]) bei seinen Untersuchungen über das Verhalten des im Eierklar sowie im Dotter

[1]) Gozo Sato, Acta scholae medicinalis in Kioto, 1, 3.

vorhandenen Traubenzuckers bei der Bebrütung von Hühnereiern eine allmähliche Abnahme des Traubenzuckergehaltes während der Bebrütung feststellen konnte. Vergleicht man diese Ergebnisse von Sato mit meinen Feststellungen betreffs der Milchsäurebildung in Hühnereiern während der Bebrütung, so kommt man ohne weiteres zu dem Schlusse, daß der im Eierklar sowie im Dotter vorhandene Traubenzucker für die Bildung der d-Milchsäure bei der Bebrütung von Bedeutung ist. Überdies sei noch folgender Untersuchung gedacht. Es handelt sich um die Fragestellung, wie der Reststickstoff der Hühnereier sich bei der Bebrütung verhält und welchen Einfluß er auf die Bildung der d-Milchsäure während der Bebrütung nimmt.

Über das Verhalten des im Eierklar sowie im Dotter vorhandenen Reststickstoffes bei Bebrütung von Hühnereiern.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Durch die Ergebnisse der vorstehenden Mitteilung kam ich zu der Anschauung, daß Traubenzucker, der im Eierklar sowie im Dotter vorhanden ist, auf die Milchsäurebildung bei der Bebrütung von Hühnereiern von einiger Wirkung ist. Die nachstehend mitgeteilten Untersuchungen hatten die Frage zur Aufgabe, wie die Reststickstofformen der Hühnereier sich bei der Bebrütung verhalten, und ob sich nicht eine Beziehung zwischen Reststickstoff und Milchsäure dabei feststellen läßt.

Daß während der Entwicklung von Embryonen eine Neubildung der stickstoffreichen Basen stattfindet, geht aus den Untersuchungen Tichomiroffs[1]) hervor. Er fand, daß die Menge von Guanin, Hypoxanthin u. a. während der Bebrütung der Eier von Bombyx mori beträchtlich zunimmt. Im Jahre 1899 hat Levene[2]) versucht, die Verschiedenheiten im Gehalte an Eiweißkörpern und an anderen stickstoffhaltigen Substanzen in bebrüteten Eiern ungleichen Alters festzustellen; er hat ferner angeführt, daß bebrütete Eier Monoaminosäuren enthalten.

Diesen Ergebnissen kann man leider nichts über die Mengenverhältnisse des Reststickstoffes entnehmen.

Für meine diesbezüglichen Versuche verwendete ich zum Teil frisch befruchtete Eier und zum Teil bebrütete Eier, die 1 Tag, 3 Tage, 7 Tage und 14 Tage alt waren.

Eierklar sowie Dotter wurden dabei sorgsam getrennt, je mit dem 5fachen Volumen Wasser durchgerührt, in einer emaillierten eisernen Schale unter Herstellung schwach saurer Reaktion durch verdünnte Essigsäure

---

[1]) Tichomiroff, Zeitschr. f. physiol. Chemie **9**, 566.

[2]) Levene, ebenda **35**, 80.

so lange im Sieden erhalten, bis das Eiweiß zur völligen Ausfällung gebracht war, und dann filtriert. Das Eiweißkoagulum wurde gründlich mit siedendem Wasser ausgewaschen; die Waschwasser wurden mit dem Filtrat vereinigt und unter vermindertem Druck eingeengt. Jetzt fügte ich so lange 20 proz. Gerbsäurelösung hinzu, als noch ein Niederschlag entstand, ließ dann längere Zeit stehen und konnte dann von der Fällung bequem abfiltrieren. Das Filtrat wurde jetzt so lange mit Barythydratlösung versetzt, bis der sich beim Umrühren des Gemisches bildende mißfarbene Schaum einen roten Farbenton annahm; es ist dies ein Zeichen, daß die Flüssigkeit einen Überschuß von Barythydrat enthält, sowie daß sämtliches Tannin in Bariumtannat übergeführt ist. Der Niederschlag von Bariumtannat wurde filtriert und gut ausgewaschen; die Waschwässer wurden mit dem Filtrat vereinigt, mit Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur des Wasserbades stark eingeengt und filtriert. Hierauf wurde das Filtrat in einen 50 ccm großen Kolben gebracht und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. An dieser Lösung wurden nun folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. In 10 ccm wurde der Stickstoff nach Kjeldahl in bekannter Weise ermittelt und als Gesamtreststickstoff bezeichnet.

2. Zu 30 ccm der Lösung wurde so viel Schwefelsäure gefügt, bis die Flüssigkeit etwa 5% davon aufwies. Nun wurde die Lösung mit einer 10 proz. Lösung von Phosphorwolframsäure versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde der abgeschiedene Niederschlag filtriert, wobei der noch am Glase haftende Rest mit Hilfe des Filtrates auf das Filter gebracht wurde. Hierauf wurde der Niederschlag samt dem Filter getrocknet und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Der Stickstoff wurde als Reststickstoff von durch Phosphorwolframsäure fällbarer Natur bezeichnet.

3. Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages aus 30 ccm der Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und auf wenige Kubikzentimeter eingeengt. Aus dieser Lösung wurde der Aminostickstoff nach van Slyke in bekannter Weise bestimmt und als Reststickstoff von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer und nach van Slykescher Methode bestimmbarer Natur benannt.

Zu diesen Versuchen verwendete ich befruchtete mittelgroße Hühnereier, und zwar benutzte ich jedesmal bei frischen und bei 1 Tag und 3 Tage bebrüteten Eiern 5, bei 7 und 14 Tage bebrüteten hingegen 12 Stück.

Meine Befunde können kurz in folgender Tabelle (s. S. 14) zusammengestellt werden.

Überblickt man die Resultate, so ergibt sich als auffallendstes Ergebnis eine sehr geringe Menge von Reststickstoff, und zwar von Aminostickstoff im Eierklars sowie im Dotter der frischen Hühnereier. Aus den angeführten Befunden ergibt sich

tracht, die eine Entwicklung des Embryos zeigen und im Vergleiche mit dem Kontrollversuche gleichartigen Entwicklungsgrad und gleiche Lebenszeichen aufweisen.

Die Isolierung der Milchsäure und ihre Bestimmung werden auf gleiche Weise wie bei Mitteilung I ausgeführt.

Die Versuchsresultate waren folgende:

1. Versuchsreihe.

30 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier wurden in oben erwähnter Weise mit je 0,1 g Traubenzucker versetzt und im Brutschrank bei 39,5° C belassen. Nach 3tägiger Bebrütung wurden die Eier gesprengt und ihr Entwicklungszustand geprüft. Zu den Versuchen fanden nur normal entwickelte Hühnereier Verwendung. Das Eierklar und der Dotter wurden jedesmal gesondert auf d-Milchsäure verarbeitet. Die Ergebnisse finden sich in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	10	260,5	2	−0,27	0,9629	0,2407	0,2257	0,0866
2	9	204,0	2	−0,16	0,5679	0,1419	0,1331	0,0652
3	10	237,5	2	−0,19	0,6790	0,1697	0,1591	0,0669
4	4	112,8	2	−0,10	0,3580	0,0895	0,0839	0.0743
								0,0732

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	10	213,0	2	−0,23	0.8148	0,2037	0,1910	0,0896
2	9	180,3	2	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0834
3	10	237,0	2	−0,20	0,7160	0,1790	0,1679	0,0708
4	4	72,5	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0710
								0,0787

Tabelle I zeigt im Mittel aus 4 Bestimmungen 0,0732% d-Milchsäure im Eierklar und 0,0787% im Dotter.

2. Versuchsreihe.

30 frische befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,2 g Traubenzucker versetzt und nach 3tägiger Bebrütung die normal entwickelten Hühnereier zu Versuchen verwendet. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Resultate.

Tabelle II.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	14	269,8	2	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0557
2	6	158,0	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0420
3	6	148,5	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0740
4	11	280,6	2	−0,21	0,7625	0,1906	0,1787	0,0636
								0,0588

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	14	274,5	2	−0,20	0,7160	0,1790	0,1679	0,0611
2	6	116,5	2	−0,10	0,3580	0,0895	0,0839	0,0720
3	6	121,0	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0621
4	11	202,7	2	−0,19	0,6790	0,1697	0,1591	0,0784
								0,0684

Der Milchsäurewert im Eierklar schwankt zwischen 0,0740% und 0,0420% und liefert im Mittel aus vier verschiedenen Bestimmungen den Wert von 0,0588%. Der höchste Milchsäurewert im Dotter beträgt 0,0784%, der niedrigste 0,0611%. Aus den vier verschiedenen Bestimmungen lassen sich 0,0684% als Mittel berechnen.

3. Versuchsreihe.

Diesmal wurden 30 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier mit je 0,05 g Traubenzucker versetzt. Zu Versuchen wurde jedesmal Material verwendet, das von 3 Tage bebrüteten und normal entwickelten Hühnereiern herrührte. Die Ergebnisse gehen aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle III.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	6	134,7	2	−0,10	0,3580	0,0895	0,0839	0,0622
2	6	107,1	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0620
3	13	285,0	2	−0,21	0,7625	0,1906	0,1787	0,0626
								0,0622

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	6	128,3	2	−0,12	0,4321	0,1080	0,1012	0,0788
2	6	133,7	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0562
3	13	250,0	2	−0,23	0,8148	0,2037	0,1910	0,0764
								0,0704

Der Mittelwert der d-Milchsäure im Eierklar beträgt 0,0622% und im Dotter 0,0704%.

4. Versuchsreihe.

Diese und die nächsten Versuchsreihen sind mit Zugabe von Alanin ausgeführt.

30 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,1 g Alanin versetzt. Nach 3tägiger Bebrütung wurden das Eierklar und der Dotter der normal entwickelten Stücke jedesmal gesondert auf d-Milchsäure verarbeitet. Die Resultate der einzelnen d-Milchsäurebestimmungen sind aus Tabelle IV ersichtlich.

Tabelle IV.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	8	178,8	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0372
2	5	114,2	2	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0379
3	11	276,5	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0393
								0,0381

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	8	152,7	2	−0,10	0,3580	0,0895	0,0839	0,0549
2	5	108,0	2	−0,07	0,2469	0,0617	0,0578	0,0535
3	11	211.8	2	−0,16	0,5679	0,1419	0,1331	0,0628
								0,0571

Die d-Milchsäure im Eierklar liefert im Mittel aus drei verschiedenen Bestimmungen den Wert von 0,0381%, der Mittelwert der d-Milchsäure im Dotter beträgt 0,0571%.

5. Versuchsreihe.

30 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier wurden nun mit je 0,05 g Alanin versetzt. Zu den Versuchen wurden 3 Tage bebrütete und normal entwickelte Eier verwendet. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle V.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Weißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	19	385,0	2	−0,17	0,6049	0,1512	0,1418	0,0368
2	11	252,5	2	−0,12	0,4321	0,1080	0,1013	0,0401
3	6	138,7	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0371
								0,0380

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	19	362,5	2	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0459
2	11	204,0	2	−0,14	0,4938	0,1234	0,1157	0,0567
3	6	120,3	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0552
								0,0526

Tabelle V zeigt im Mittel aus drei verschiedenen Bestimmungen 0,0380% d-Milchsäure im Eierklar und 0,0526% im Dotter.

6. Kontrollversuche.

In der Mitteilung I habe ich den Milchsäurewert der bebrüteten Hühnereier bestimmt. Ich muß hier daran erinnern, daß in der Portion der Eier, die bei 3tägiger Bebrütung analysiert wurden, der Milchsäuregehalt im Eierklar zu 0,0415% und im Dotter zu 0,0790% bestimmt war. Jetzt wurden noch einige besondere Kontrollversuche angestellt, die stets unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorliegenden Versuchen ausgeführt wurden. Ich lasse die Ergebnisse in Tabelle VI folgen.

Tabelle VI.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Eiweißes in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	10	246,4	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0445
2	14	250,3	2	−0,12	0,4321	0,1080	0,1012	0,0404
3	6	141,0	2	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0365
4	8	169,2	2	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0419
5	15	274,6	2	−0,13	0,4691	0,1172	0,1099	0,0400
								0,0406

b) Dotter.

Versuchsnummer	Zahl der verwendeten Eier	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Rohrlänge in dcm	α	c	Menge des gefundenen Li-Lactates in g	Gefund. d-Milchsäure in g	Gefund. d-Milchsäure in %
1	10	217,2	2	−0,19	0,6790	0,1697	0,1591	0,0732
2	14	327,0	2	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0459
3	6	105,3	2	−0,09	0,3209	0,0802	0,0752	0,0714
4	8	158,5	2	−0,16	0,5679	0,1419	0,1331	0,0839
5	15	291,5	2	−0,27	0,9629	0.2407	0,2257	0,0774
								0,0703

Der Mittelwert der d-Milchsäure im Eierklar beträgt 0,0406% und im Dotter 0,0703%. Dieser Wert stimmt fast mit dem, der in der ersten Abhandlung ermittelt war, überein.

Um einen Vergleich der in dieser Mitteilung ausgeführten Versuche mit der Kontrolle zu erleichtern, stellte ich in folgender Tabelle die Resultate, in Prozenten des Mittelwertes der d-Milchsäure ausgedrückt, zusammen.

Tabelle VII.

Bebrütungsdauer	Menge der d-Milchsäure in %		Bemerkungen
	im Eierklar	im Dotter	
3 Tage	0,0732	0,0787	Mit je 0,1 g Glucose
3 „	0,0588	0,0684	„ „ 0,2 g „
3 „	0,0622	0,0704	„ „ 0,05 g „
3 „	0,0381	0,0571	„ „ 0,1 g Alanin
3 „	0,0380	0,0526	„ „ 0,05 g Alanin
3 „	0,0406	0,0703	Kontrolle

Aus den dargestellten Untersuchungen kann man folgende Schlüsse ziehen:

1. Durch Zusatz von Traubenzucker zum Weißei steigt der Gehalt des Eierklars an d-Milchsäure. Dabei ist der Gehalt des Dotters von der zugesetzten Zuckermenge unabhängig.

2. Auf Zugabe von Traubenzucker ändert sich die Vermehrung der d-Milchsäure etwas. Bei Hinzufügung von je 0,1 g Traubenzucker steigt der Milchsäuregehalt von 0,0406% auf 0,0732%, beim Zusatz von je 0,05 g Traubenzucker auf 0,0622%, durch Beigabe von je 0,2 g Glucose dagegen steigt er von 0,0406% auf 0,0588%.

3. Bei Zusatz von Alanin konnte ich eine Steigerung des Milchsäuregehaltes von Eierklar sowie von Dotter niemals nachweisen; ja ich bemerkte sogar ein Absinken des Milchsäuregehaltes des Dotters von 0,0703% auf 0,0572% und 0,0526%.

Demnach ist der Übergang von Zucker in d-Milchsäure bei der Bebrütung von Hühnereiern sehr wahrscheinlich, der von Aminosäure dagegen unsicher.

Es war aber hier noch die Frage aufzuwerfen, ob die hinzugefügte Glucose sich selbst direkt in d-Milchsäure umwandelt oder als Reizstoff auf die Milchsäurebildung einwirkt. Ich behalte mir eine spätere Mitteilung über diese Frage, deren Bearbeitung ich bereits begonnen habe, vor.

Über das Verhalten des bei der Bebrütung von Hühnereiern dem Eiweiß zugesetzten Traubenzuckers.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Aus der voranstehenden Mitteilung war der Schluß zu ziehen, daß Glucose am Bildungsprozeß der Milchsäure bei der Bebrütung des Hühnereies beteiligt ist und daß Alanin dagegen unberührt bleibt. Aber es war unentschieden, ob hier die Glucose eine Quelle der Milchsäure darstellt oder ob sie nur katalytische Wirkungen ausübte.

Zwecks Lösung dieser Frage wollen wir zuerst das Schicksal des zugegebenen Traubenzuckers während der Bebrütung verfolgen; dabei war die Bestimmung der Abnahme zugefügten Traubenzuckers unerläßlich.

Die folgenden Versuche liefern einen Beitrag zu deu oben gestellten Fragen. Zu Versuchen bediente ich mich stets befruchteter Hühnereier.

Die Zugabe des Traubenzuckers und bzw. Alanins zum Weißei erfolgte nach der zuvor geschilderten Methode; nur ließ ich diesmal statt im Brutschrank vom Huhn bebrüten.

Die Bestimmung des Traubenzuckers im Eierklar und im Dotter geschah, indem nach Schenck enteiweißt, der Traubenzucker dann nach Bertrand titriert wurde.

1. Versuchsreihe (Kontrollversuche).

Eierklar und Dotter aus frischem Hühnerei werden gesondert auf Traubenzucker verarbeitet. Die Ergebnisse der einzelnen Traubenzuckerbestimmungen gehen aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle I.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars in g	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar in mg	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar in %	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter in mg	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter in %
1	20,3	93,4	0,46	16,9	42,3	0,25
2	17,9	79,0	0,43	15,5	34,1	0,22
3	22,0	108,0	0,49	18,6	46,5	0,25
4	21,2	95,4	0,45	17,4	40,1	0,23
5	20,7	105,6	0,51	15,3	36,8	0,24
6	24,5	120,0	0,49	20,1	52,3	0,26
			0,47			0,24

Tabelle I zeigt im Mittel aus 6 Bestimmungen 0,47% Traubenzucker im Eierklar und 0,24% im Dotter, übereinstimmend mit der Angabe von Gozo Sato[1]).

2. Versuchsreihe (Kontrollversuche).

Das Eierklar und der Dotter von 3 Tage lang bebrüteten Hühnereiern werden auf Traubenzucker verarbeitet. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars in g	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar in mg	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar in %	Gewicht des verwendeten Dotters in g	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter in mg	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter in %
1	21,2	85,5	0,40	17,3	36,6	0,21
2	33,1	159,3	0,46	23,8	55,6	0,23
3	25,9	122,1	0,47	22,4	46,7	0,21
4	20,5	75,5	0,37	24,1	35,4	0,15
5	25,9	111,9	0,45	19,6	35,3	0,18
6	22,4	105,3	0,47	17,5	38,5	0,22
7	20,8	85,3	0,41	21,2	42,8	0,20
			0,43			0,20

Vergleicht man die in Tabelle II eingetragenen Mittelwerte des Traubenzuckers mit denjenigen des Traubenzuckers in Tabelle I, so fällt es auf, daß der Traubenzucker im Eierklar und im Dotter bei 3tägiger Bebrütung eine geringfügige Abnahme erfährt.

[1]) Gozo Sato, Acta scholae medicinalis universitatis imperialis in Kioto Vol. 1, Fasc. 3.

3. Versuchsreihe.

Das Weiß von 15 mittelgroßen frisch befruchteten Hühnereiern wird nach der in der früheren Mitteilung erwähnten Angabe mit je 0,1 g Traubenzucker versetzt und durch ein Huhn bebrütet. Nach 3tägiger Bebrütung werden die Eischalen gesprengt und ihr Entwicklungsgrad geprüft. Von einem normal entwickelten Hühnerei wird der Inhalt möglichst vollständig ausgenommen und das Eierklar und der Dotter gesondert auf Traubenzucker verarbeitet. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Resultate.

Tabelle III.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars	a) Menge des zugesetzten Traubenzuckers im Weißei		b) Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar		c) b − 0,48% (wo 0,48% = Mittelwert des Traubenzuckers im Eierklar des Kontrollversuches)	a—c
	in g	in mg	in %	in mg	in %		
1	21,3	100	0,47	180,7	0,84	0,41	0,06
2	25,3	100	0,39	117,1	0,70	0,27	0,12
3	26,2	100	0,38	164,3	0,62	0,19	0,19
4	22,5	100	0,44	164,3	0,73	0,30	0,14
5	29,7	100	0,33	216,2	0,72	0,29	0,04
6	29,2	100	0,34	161,3	0,55	0,12	0,22
7	24,8	100	0,40	168,0	0,68	0,25	0,15
			0,39		0,69	0,26	0,13

b) Dotter.

Versuchsnummer	Gewicht d. verwendeten Dotters in g	Menge des versetzten Traubenzuckers im Weißei		Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter	
		in mg	in %	in mg	in %
1	17,0	100	0,47	37,7	0,22
2	18,6	100	0,39	35,4	0,19
3	20,9	100	0,38	42,2	0,20
4	17,5	100	0,44	35,8	0,20
5	18,3	100	0,33	32,9	0,18
6	20,3	100	0,34	47,8	0,23
7	19,1	100	0,40	40,2	0,21
					0,20

Vergleicht man nun diese Daten mit denen der Tabelle II, so läßt sich nicht verkennen, daß der dem Weißei zugefügte Traubenzucker bei 3tägiger Bebrütung eine Abnahme erfährt, die zwischen 0,04 und 0,22% schwankt und im Mittel aus sieben verschiedenen Bestimmungen 0,13% beträgt, während der Gehalt des Dotters an Traubenzucker unverändert bleibt.

4. Versuchsreihe.

10 frische befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,05 g Traubenzucker versetzt und nach 3tägiger Bebrütung die normal entwickelten Hühnereier zu Versuchen verwendet.

Tabelle IV.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars in g	a) Menge des zugesetzten Traubenzuckers im Weißei		b) Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar		c) b − 0,48% (wo 0,48% = Mittelwert des Traubenzuckers im Eierklar des Kontrollversuches)	a—c
		in mg	in %	in mg	in %		
1	22,0	50	0,22	105,6	0,48	0,05	0,17
2	25,0	50	0,20	117,0	0,47	0,04	0,16
3	23,4	50	0,21	125,5	0,53	0,10	0,11
4	26,7	50	0,18	146,9	0,55	0,12	0,06
5	24,5	50	0,20	125,2	0,51	0,08	0,12
			0,20		0,51	0,08	0,12

b) Dotter.

Versuchsnummer	Gewicht d. verwendeten Dotters in g	Menge des versetzten Traubenzuckers im Weißei		Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter	
		in mg	in %	in mg	in %
1	23,8	50	0,22	43,9	0,18
2	19,8	50	0,20	40,5	0,20
3	20,3	50	0,21	38,6	0,19
4	21,6	50	0,18	47,6	0,22
5	18,9	50	0,20	37,8	0,20
					0,19

Tabelle IV zeigt eine Abnahme des zugesetzten Traubenzuckers im Eierklar, die sich im Mittel aus 5 Bestimmungen auf 0,12% belief.

Durch Zugabe von Traubenzucker zum Weißei wird der Glucosegehalt des Dotters nicht beeinflußt.

5. Versuchsreihe.

Diesmal wurden 10 frische befruchtete Hühnereier mit je 0,2 g Traubenzucker versetzt. Zu Versuchen wurde jedesmal Material verwendet, das von 3 Tage bebrüteten und normal entwickelten Hühnereiern herrührte. Die Resultate gehen aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle V.

a) Eierklar.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendet. Eierklars	a) Menge des zugesetzten Traubenzuckers im Weißei		b) Gefundene Menge des Traubenzuckers im Weißei		c) b - 0,48%	a—c
	in g	in %	in mg	in mg	in %		
1	24,7	200	0,81	273,2	1,10	0,67	0,14
2	26,5	200	0,75	286,2	1,08	0,65	0,10
3	24,9	200	0,80	239,2	0,96	0,53	0,27
4	23,1	200	0,86	279,8	1,21	0,78	0,08
			0,80		1,08		0,14

b) Dotter.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Dotters in g	a) Menge des zugesetzten Traubenzuckers im Weißei		b) Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter	
		in mg	in %	in mg	in %
1	17,6	200	0,81	32,2	0,18
2	20,9	200	0,75	35,6	0,17
3	20,2	200	0,80	45,4	0,22
4	17,1	200	0,86	35,9	0,21
					0,19

Die Versuchsresultate der Tabelle 5 zeigen, daß der dem Weißei zugesetzte Traubenzucker auch diesmal eine Abnahme erfahren hat.

6. Versuchsreihe.

Vergleichsweise seien hier noch einige Versuche mit Alaninzugabe angeführt. 10 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,1 g Alanin versetzt und nach 3tägiger Bebrütung das Eierklar und der Dotter der normal entwickelten Eier jedesmal gesondert auf Traubenzucker verarbeitet. Die Resultate der einzelnen Traubenzuckerbestimmungen sind aus Tabelle VI ersichtlich.

Tabelle VI.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar		Gewicht des verwendeten Dotters	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter	
	in g	in mg	in %	in g	in mg	in %
1	24,9	97,8	0,39	18,9	34,5	0,18
2	23,0	96,9	0,42	17,7	35,8	0,20
3	25,2	106,5	0,42	21,5	38,8	0,18
			0,41			0,18

Der Traubenzuckergehalt des Eierklars war im Mittel aus drei verschiedenen Bestimmungen 0,41%; der Mittelwert des Traubenzuckers im Dotter betrug 0,18%.

7. Versuchsreihe.

10 mittelgroße frische und befruchtete Hühnereier wurden mit je 0,05 g Alanin versetzt. Zu den Versuchen wurden 3 Tage lang bebrütete und normal entwickelte Eier verwendet.

Tabelle VII.

Versuchsnummer	Gewicht des verwendeten Eierklars	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Eierklar		Gewicht des verwendeten Dotters	Gefundene Menge des Traubenzuckers im Dotter	
	in g	in mg	in %	in g	in mg	in %
1	21,5	81,5	0,37	19,3	30,0	0,15
2	24,2	99,3	0,41	20,5	36,7	0,18
3	24,8	109,3	0,44	18,6	44,8	0,24
			0,40			0,19

Der Mittelwert des Traubenzuckers im Eierklar beträgt 0,40% und im Dotter 0,19%. Dieser Wert stimmt beinahe mit dem überein, der im Kontrollversuche ermittelt war.

Es folgt nun eine Tabelle, die die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Traubenzucker im Eierklar und im Dotter enthält.

Tabelle VIII.

Bebrütungsdauer	Versetzte Menge des Traubenzuckers im Weißei in %	Menge des Traubenzuckers im Eierklar in %	Menge des Traubenzuckers im Dotter in %	Bemerkungen
—	0	0,47	0,24	verwendete frische Eier.
3 Tage	0	0,43	0,20	Kontrolle.
"	0,39	0,69	0,20	mit je 0,1 g Traubenzucker versetzt.
"	0,20	0,51	0,19	" " 0,05 g " "
"	0,80	1,08	0,19	" " 0,2 g " "
"	0	0,41	0,18	" " 0,1 g Alanin versetzt.
"	0	0,40	0,19	" " 0,05 g " "

Über die Bildung der Fleichmilchsäure im tierischen Organismus.

Über die Bildung von d-Milchsäure bei der Autolyse des Hühnereies.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Durch die in den voranstehenden vier Mitteilungen geschilderten Untersuchungen über die Bildung der d-Milchsäure im tierischen Organismus ist von mir der Nachweis erbracht worden, daß bei der Bebrütung des Hühnereies, bei Neubildung von Fleischmilchsäure, sich eine bedeutende Vermehrung des Milchsäuregehaltes des Eierklars durch Zugabe von Traubenzucker zum Weißei ergibt, während dies nach Zugabe von Alanin nicht der Fall ist; ferner, daß hier die Glucose sehr wahrscheinlich nicht katalytisch wirkt, sondern sich als Muttersubstanz der Fleischmilchsäure erweist. Aber die Frage, in welcher Weise sich diese Milchsäurebildung im Hühnerei vollzieht, und ob die Milchsäure bei der Bebrütung der Hühnereier mit Sicherheit überhaupt nicht aus Aminosäuren herstammt, hat damit noch keine Beantwortung gefunden.

Während auf der einen Seite am lebenden Tier die Grundlagen für die Erkenntnis seines Chemismus geschaffen werden, wäre es erwünscht gewesen, auf eine andere Weise zum gleichen Ziel dadurch zu gelangen, daß man jene Vorgänge unter Bedingungen herbeizuführen sucht, die denen des Organismus möglichst nahe kommen. Deswegen scheint mir der Autodigestionsversuch besonders wichtig zu sein. Wenn sich einmal die Resultate am lebenden Tier bei der Autolyse andererseits begegnen sollten, so wird eine Erweiterung der Erkenntnis gewonnen werden.

Magnus-Lewy[1]) hat angegeben, daß bei der Autolyse der Leber von Hunden und Rindern sich ein Gemenge von Rechtsmilchsäure und inaktiver Milchsäure in reichlicher Menge bildet. Über die Herkunft der neu gebildeten Milchsäure äußerte sich Magnus-Lewy folgendermaßen: „Nach dem Gesagten darf man in jenen Fällen, wo reichlich Kohlenhydrat vorliegt, auf eine Umwandlung dieses zu Milchsäure schließen; aus welchem Anteil diese Säure entsteht, wenn vorgebildete Kohlenhydrate fehlen, so beim Phloridzintier, kann bloß vermutet werden." J. Mochizuki und R. Arima[2]) hatten Untersuchungen über die Milchsäurebildung bei der Autolyse von Stierhoden ausgeführt und gezeigt, daß dabei die d-Milchsäure eine gewaltige Zunahme erfährt, und daß ein Enzym im Stierhoden vorhanden ist, das die Fähigkeit besitzt, Rechtsmilchsäure aus einer anderen Verbindung zu bilden. In der Fortsetzung der Arbeit von Mochizuki und Arima hat T. Kikkoji[3]) die Untersuchungen über die Milchsäurebildung bei der Autolyse der Rindermilz unternommen und konstatiert, daß dabei eine reichliche Produktion der Milchsäure aus unbekannten Quellen stattfindet, und daß die entstandene Milchsäure durch längerdauernde Digestion mehr oder weniger zerstört wird. K. Inouye und K. Kondo[4]) haben ferner dargetan, daß bei der Autolyse der Muskeln von verschiedenen Tieren eine bedeutende Zunahme der d-Milchsäure erfolgt, und daß die Entstehung der Rechtsmilchsäure in den autolysierten Muskeln nicht mit dem Zelleben in direktem Zusammenhang steht, sondern als ein rein chemischer Vorgang zu betrachten ist. Als Ergänzung der im hiesigen Institut ausgeführten Untersuchungen über Milchsäurebildung bei der Autolyse der Organe haben neuerdings T. Harada[5]) und M. Hijikata[6]) diese Verhältnisse auch bei der Placenta und dem Glaskörper geprüft und in Übereinstimmung mit der Beobachtung von T. Mochizuki und R. Arima[7]) beim Stierhoden die bedeutende Zunahme von d-Milchsäure bei der Autolyse der Placenta und des Glaskörpers konstatiert.

Um die Untersuchungen über Milchsäurebildung bei der Autolyse der Organe zu ergänzen und um ferner die chemischen Vorgänge bei der Autolyse mit denen im lebenden Organismus zu vergleichen und damit einen Beitrag zur Kenntnis der Herkunft und damit der Bildungsweise der Fleischmilchsäure zu liefern, habe ich das Studium der Autolyse von Hühnereiern unternommen.

---

[1]) Magnus-Lewy, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 261.
[2]) J. Mochizuki und R. Arima, H. 49, 108.
[3]) T. Kikkoji, H. 52, 399.
[4]) K. Inoyue und K. Kondo, H. 52, 481.
[5]) T. Harada, Acta scholae medicinalis in Kioto, 1, 291.
[6]) M. Hijikata, Acta scholae medicinalis in Kioto, 3, 207.
[7]) T. Mochizuki und R. Arima, l. c.

Die Milchsäurebildung bei der Autolyse der Hühnereier.

Die Versuchsordnung ist dieselbe wie sie bei den Arbeiten von T. Kikkoji, K. Inouje und K. Kondo ausführlich beschrieben worden ist.

Das Eierklar und der Dotter wurden jedesmal gesondert verarbeitet. Sie wurden sorgfältig getrennt und dann, um eine gleichmäßige Flüssigkeit zu erhalten, durch die feinen Poren einer Porzellannutsche gesaugt.

Das so gewonnene Eierklar und der Dotter wurden in 2—5 gleiche Portionen geteilt, wovon die beiden ersten Portionen sofort auf Milchsäure verarbeitet und von den übrigen jede für sich mit Chloroformwasser durchgemischt und bei 37°—38° C digeriert wurde. Jede digerierte Portion wurde erst dann auf Milchsäure verarbeitet, nachdem ihre Sterilität festgestellt war. Die Isolierung der d-Milchsäure und ihre Bestimmung wurden auf die zuvor angegebene Art ausgeführt. Die erhaltene Lithiumlactatlösung wurde bei allen Portionen bis auf 25 ccm aufgefüllt und in einem 2 dcm-Rohr polarisiert.

Die Versuchsresultate seien im folgenden mitgeteilt.

1. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden zwei Portionen zu je 690 g abgewogen, die erste dann sofort, die zweite nach 3tägiger Digestion auf Milchsäure verarbeitet. Vom abgesaugten Dotter derselben Eier wurden zwei Portionen zu je 405 g abgewogen, die erste sofort verarbeitet, die zweite digeriert.

Die Ergebnisse des Versuches sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht des Eierklars in g	α	C	Daraus berechnete Menge		
				des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sofort verarbeitet	690	−0,03	0,1111	0,0277	0,0260	0,0037
3 Tage	690	−0,03	0,1111	0,0277	0,0260	0,0037

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	α	C	Daraus berechnete Menge		
				des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sofort verarbeitet	405	−0,12	0,4321	0,1080	0,1002	0,0247
3 Tage	405	−0,25	0,8888	0,2222	0,2084	0,0514

2. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden 3 Portionen zu je 430 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden 3 Portionen zu je 280 g abgewogen. Die beiden ersten Portionen wurden sofort, die übrigen nach der Digestion auf Milchsäure verarbeitet.

Die Resultate sind in folgender Tabelle angeführt.

Tabelle II.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht des Eierklars in g	α	C	Daraus berechnete Menge des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sofort verarbeitet	430	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0037
3 Tage	430	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0037
7 Tage	430	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0037

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	α	C	Daraus berechnete Menge des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sofort verarbeitet	280	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0238
3 Tage	280	−0,23	0,8148	0,2037	0,1910	0,0682
7 Tage	280	−0,21	0,7625	0,1906	0,1787	0,0638

3. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 240 g abgewogen, die erste sofort, die übrigen nach der Digestion auf Milchsäure verarbeitet. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden 4 Portionen zu je 150 g abgewogen, die erste sofort auf Milchsäure untersucht, die übrigen digeriert.

Die Ergebnisse sind aus nachstehender Tabelle zu ersehen.

Tabelle III.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht des Eierklars in g	α	C	Daraus berechnete Menge des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
sofort verarbeitet	240	− 0,01	0,0370	0,0092	0,0086	0,0035
3 Tage	240	− 0,01	0,0370	0,0092	0,0086	0,0035
5 „	240	− 0,01	0,0370	0,0092	0,0086	0,0035
14 „	240	− 0,01	0,0370	0,0092	0,0086	0,0035

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	α	C	Daraus berechnete Menge des Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
sofort verarbeitet	150	– 0,04	0,1481	0,0370	0,0347	0,0231
3 Tage	150	– 0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0443
7 „	150	– 0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0443
14 „	150	– 0,04	0,1481	0,0370	0,0347	0,0231

Aus den geschilderten Versuchsresultaten geht hervor, daß bei der Autolyse des Dotters des Hühnereies die d-Milchsäure eine gewaltige Zunahme erfährt, und daß dann die entstandene Milchsäure durch längerdauernde Digestion mehr oder weniger wieder zerstört wird, und daß bei der Autolyse des Eierklars dagegen die Milchsäuremenge immer konstant bleibt und niemals eine Vermehrung der Milchsäure stattfindet.

Wenn wirklich, wie ich bereits in meinen voranstehenden Mitteilungen erwähnt habe, die bei der Bebrütung des Hühnereies auftretende Milchsäure als ein Produkt der Glykolyse aufzufassen war, so lag es nahe, zu prüfen, ob auch bei der Autolyse des Hühnereies unter Zusatz von Traubenzucker größere Mengen von Milchsäure gebildet würden als ohne eine solche Zugabe.

Die Ergebnisse derartiger Versuche werden im folgenden mitgeteilt.

4. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden 5 Portionen zu je 270 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden auch 5 Portionen zu je 160 g abgewogen. Die beiden ersten Portionen wurden sofort, die zweiten nach 3tägiger Digestion auf Milchsäure verarbeitet,

Tabelle IV.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht d. Eierklars in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	270		–0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 Tage	270		–0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 „	270	0,5	–0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 „	270	1,5	–0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 „	270	2,0	–0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060

die übrigen dann nach Zusatz von je 0,5 g, 1,0 g und 2,0 g Traubenzucker der Digestion unterworfen.

Die vorangehende Tabelle zeigt die Ergebnisse.

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	160		−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0270
3 Tage	160		−0,28	0,8148	0,2037	0,1910	0,1193
3 „	160	0,5	−0,36	1,2839	0,3209	0,3010	0,1881
3 „	160	1,0	−0,38	1,3580	0,3395	0,3184	0,1990
3 „	160	2,0	−0,55	1,9878	0,4969	0,4660	0,2912

5. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 220 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier desgleichen 4 Portionen zu je 140 g. Die beiden ersten wurden sofort, die zweiten nach 7tägiger Digestion auf Milchsäure verarbeitet, die übrigen nach Zusatz von je 1,0 g und 2,0 g Traubenzucker zur Digestion angesetzt. Folgendes ergab sich:

Tabelle V.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht d. Eierklars in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	320	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0050
7 Tage	320	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0050
7 „	320	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0050
7 „	320	2,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0050

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	240	—	−0,08	0,2839	0,0709	0,0665	0,0277
7 Tage	240	—	−0,20	0,7160	0,1790	0,1679	0,0699
7 „	240	1,0	−0,41	1,4691	0,3672	0,3444	0,1435
7 „	240	2,0	−0,60	2,1728	0,5432	0,5095	0,2122

6. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 250 g abgewogen. Vom

abgenutschten Dotter derselben Eier wurden auch 4 Portionen zu je 150 g abgewogen. Die beiden ersten Portionen wurden sofort, die zweiten nach 14tägiger Digestion auf d-Milchsäure verarbeitet, die übrigen nach Zusatz von je 1,0 g und 2,0 g Traubenzucker der Autolyse unterzogen.

Die Resultate sind aus nachstehender Tabelle ersichtlich.

Tabelle VI.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht d. Eierklars in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	250	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0 0064
14 Tage	250	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064
14 "	250	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064
14 "	250	2,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugesetzten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge des Li-Lactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	150	—	−0,07	0,2469	0,0617	0,0578	0,0385
14 Tage	150	—	−0,12	0,4321	0,1080	0,1013	0,0675
14 "	150	1,0	−0,45	1,6172	0,4043	0,3792	0,2528
14 "	150	2,0	−0,58	2,0908	0,5246	0,4920	0,3280

7. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus den frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 300 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden auch 4 Portionen zu je 190 g abgewogen. Die beiden ersten wurden sofort, die übrigen nach Zusatz von je 1,0 g Traubenzucker sowie nach der Digestion auf Milchsäure verarbeitet. Dabei zeigte sich folgendes.

Tabelle VII.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht d. Eierklars in g	Menge des zugefügten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	300	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0054
3 Tage	300	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0054
7 "	300	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0054
14 "	300	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0054

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugefügten Traubenzuckers in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sof. verarb.	190	—	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0271
3 Tage	190	1,0	−0,45	1,6172	0,4043	0,3792	0,1995
7 „	190	1,0	−0,42	1,5061	0,3765	0,3531	0,1858
14 „	190	1,0	−0,41	1,4691	0,3672	0,3444	0,1812

Es kann sonach keinem Zweifel unterliegen, daß der Zuckerzusatz zum Dotter die Menge der bei der Autolyse gebildeten Milchsäure im Sinne einer häufig ganz gewaltigen Steigerung beeinflußt, während der Gehalt des Eierklars an d-Milchsäure immer konstant bleibt und von Zuckerzusätzen nicht beeinflußt wird.

Hiermit wäre es in hohem Maße wahrscheinlich, daß bei der Autolyse des Dotters sich der Übergang von Traubenzucker in d-Milchsäure vollzieht, und daß ein Enzym nicht im Eierklar, sondern im Dotter vorhanden ist, das die Fähigkeit besitzt, d-Milchsäure aus Traubenzucker zu bilden.

Wir haben jetzt auf die Frage einzugehen, wie sich die Aminosäuren in Beziehung auf die Milchsäurebildung bei der Autolyse des Hühnereies verhalten. Zur Entscheidung dieser Frage waren einige Versuche unter Zusatz von Alanin angestellt, deren Resultate im folgenden mitgeteilt werden.

8. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 270 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden auch 4 Portionen zu je 150 g abgewogen. Die beiden ersten wurden sofort, die zweiten nach 3tägiger Digestion auf Milchsäure verarbeitet, die übrigen nach Zusatz von je 1,0 g und 2,0 g Alanin zur Digestion angesetzt. Die Versuchsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle VIII.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht des Eierklars in g	Menge des zugesetzten Alanins in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	der d-Milchsäure in %
Sof. verarb.	270	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 Tage	270	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 „	270	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060
3 „	270	2,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0060

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugesetzten Alanins in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	150	—	−0,05	0,1851	0,0462	0,0433	0,0288
3 Tage	150	—	−0,23	0,8148	0,2037	0,1910	0,1273
3 „	150	1,0	−0,23	0,8148	0,2037	0,1910	0,1273
3 „	150	2,0	−0,22	0,7777	0,1944	0,1823	0,1215

9. Versuchsreihe.

Vom abgenutschten Eierklar aus frischen befruchteten Hühnereiern wurden 4 Portionen zu je 250 g abgewogen. Vom abgenutschten Dotter derselben Eier wurden ebenfalls 4 Portionen zu je 180 g abgewogen. Die beiden ersten Portionen wurden sofort, die zweiten nach 7tägiger Digestion auf d-Milchsäure verarbeitet, die übrigen nach Zusatz von je 1,0 g und 2,0 g Alanin autolysiert.

Tabelle IX.

a) Eierklar.

Dauer der Digestion	Gewicht des Eierklars in g	Menge des zugesetzten Alanins in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	250	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064
7 Tage	250	—	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064
7 „	250	1,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064
7 „	250	2,0	−0,02	0,0699	0,0174	0,0162	0,0064

b) Dotter.

Dauer der Digestion	Gewicht des Dotters in g	Menge des zugesetzten Alanins in g	α	C	Daraus berechnete Menge d. Lithiumlactates in g	der d-Milchsäure in g	in %
Sof. verarb.	180	—	−0,06	0,2222	0,0555	0,0515	0,0286
7 Tage	180	—	−0,19	0,6790	0,1697	0,1591	0,0883
7 „	180	1,0	−0,17	0,6049	0,1512	0,1418	0,0787
7 „	180	2,0	−0,18	0,6419	0,1604	0,1504	0,0835

Es kann daraufhin kaum einem Zweifel unterliegen, daß sich Alanin in Beziehung auf die Milchsäurebildung ganz anders verhält als der Traubenzucker. Übereinstimmend mit dem Versuche bei der Bebrütung des Hühnereies ist durch Alaninzusatz keineswegs eine Mehrbildung von Milchsäure hervorgerufen worden. Mit und ohne Alaninzusatz im Eierklar und auch im Dotter blieb

die Menge von Rechtsmilchsäure bei der Autolyse des Hühnereies gleich. Wenn Alanin bei der Milchsäurebildung, sei es während der Bebrütung, sei es während der Autolyse des Hühnereies, mitgewirkt hätte, so hätte ein Zusatz dieser Substanz zum Hühnerei die Milchsäurebildung im Sinne einer Steigerung beeinflussen müssen. Dies trat aber nicht ein.

Die hier mitgeteilten Untersuchungen sind noch keineswegs abgeschlossen und bedürfen noch nach manchen Seiten einer Vervollständigung und eingehenderen Behandlung. Weitere diesbezügliche Untersuchungen sind zur Klärung der Sache bereits im Gang. Immerhin berechtigen die bereits vorliegenden Beobachtungen zu bestimmten Folgerungen.

Zusammenfassung.

Blicken wir nun noch einmal auf die im Vorhergehenden niedergelegten Arbeiten zurück, so ergibt sich als völlig sichere Tatsache, daß sowohl bei der Bebrütung als auch bei der Autolyse des Hühnereies d-Milchsäure aus Traubenzucker gebildet wird. Obwohl man davon überzeugt sein darf, daß d-Milchsäure im tierischen Organismus mit Sicherheit vom Traubenzucker herstammt und sehr wahrscheinlich nicht aus Aminosäuren, so vermag ich doch vorderhand die Möglichkeit einer Milchsäurebildung aus Eiweiß nicht zu leugnen. Embden[1]) und Mitarbeiter haben sich auch über die Quelle der Rechtsmilchsäure im Muskelpreßsaft geäußert; sie sagen: „Freilich mußte schon ein Umstand uns von vornherein die Herkunft der Milchsäure aus Kohlenhydrat zweifelhaft erscheinen lassen. In mehreren Fällen nämlich, in denen wir den Preßsaft sofort nach seiner Gewinnung auf Glykogen mittels der abgekürzten Pflügerschen Methode untersuchten, konnten wir Glykogen überhaupt nicht nachweisen. Und ferner lieferte auch die Untersuchung des im Vakuum stark eingeengten, entquecksilberten und neutralisierten Preßsaftfiltrates nur Anhaltspunkte für das Vorhandensein ganz außerordentlich geringer Zuckermengen. Offenbar war das Glykogen bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht in den Preßsaft übergegangen." Neuerdings hat K. Taguchi im hiesigen Institut durch eingehende Untersuchungen den Nachweis erbracht, daß bei der Autolyse der Muskeln von den Karenztieren, wo Glykogen und

[1]) Embden, Kalberlah und Engel, diese Zeitschr. 45, 56.

Zucker spärlich vorhanden sind oder fast völlig fehlen, die Rechtsmilchsäure eine gewaltige Zunahme erfährt.

Wie dem aber auch sei, die Verhältnisse, unter denen das Verschwinden des Traubenzuckers, die Vermehrung von Aminosäuren und keine Neubildung der Rechtsmilchsäure im Eierklar sowie im Dotter in den späteren Stadien der Bebrütung zustande kommen, und die Tatsache, daß bei der Bebrütung sowie bei der Autolyse der Hühnereier die Mehrbildung von Milchsäure durch Alaninzusatz keineswegs hervorgerufen wird, machen es wenig wahrscheinlich, daß hierbei eine direkte Umwandlung von Eiweiß in Milchsäure durch Desamidierung von Aminosäuren in Betracht kommt. Von vornherein wäre es auch nicht undenkbar, daß hier die Milchsäure aus einer anderen Quelle als aus den mit unserer Methode bestimmbaren Kohlenhydraten hervorgeht. Denkbar ist ja auch die Glukoneogenie aus Nichtkohlenhydraten, aus den mehr oder minder fernstehenden Baustämmen des Eiweißes und des Fettes. Daraus möchte ich schließen, daß die d-Milchsäure im tierischen Organismus hauptsächlich aus Kohlenhydraten stammt und erst dann aus Eiweiß entstehen kann, wenn es zum Verbrauch des Kohlenhydrates kommt, und daß die Umwandlung des Eiweißes zu Milchsäure wahrscheinlicherweise nicht ohne weiteres durch Desaminierung von Aminosäuren, sondern durch Zuckerumbildung zustande kommt.

Werfen wir hiernach nun noch einen Blick auf die im Vorangehenden mitgeteilten Ergebnisse, so wissen wir, daß das Verhalten der Milchsäurebildung bei der Autolyse des Dotters ganz das gleiche ist wie bei der Bebrütung. Wohl wirken nach dem Tode der Zelle noch die Triebkräfte, die in der Zelle im Momente des Todes vorhanden waren, in Wirklichkeit sind aber zunächst keine neuen Wirkungsfaktoren vorhanden. Daher ist es auch möglich, die Fermente der Zelle noch nach dem Absterben aufzufinden und sie in der toten Zelle als wesentliche Triebkräfte der lebenden Zelle aufzudecken. Im Tode fällt Zufuhr und Abfuhr fort und „nach dem Tode arbeiten sich die Kräfte, die vergebens nach ihren alten Bestimmungen zu wirken suchen, ab an der Zerstörung der Teile, die sie sonst belebten.“

Wie hat man sich nun im allgemeinen die Vorgänge der Milchsäurebildung aus Traubenzucker im bebrüteten Hühnerei zu denken? Auf welchem Wege ist das im Dotter vorhandene Fer-

ment imstande, den dem Weißei zugefügten Traubenzucker in Milchsäure umzuwandeln?

Auf Grund der bisher gewonnenen Resultate kann man ein Bild von den chemischen Prozessen der Milchsäurebildung aus Traubenzucker während der Bebrütung der Hühnereier folgendermaßen entwerfen. Vorausgesetzt, daß kein milchsäurebildendes Ferment durch die Dotterhaut zu diffundieren vermag, geht die Fermentwirkung allein im Innern der Dotterhaut vor sich, und daher diffundieren der im Eierklar vorhandene und der in das Weißei hineingebrachte Traubenzucker zuerst durch die Dotterhaut in den Dotter hinein. Im Dotter werden sie zu Milchsäure abgebaut, und dann diffundiert die jetzt im Dotter entstandene d-Milchsäure wieder durch die Dotterhaut in das umgebende Eierklar hinaus. Da man nun die Ansicht nicht von der Hand weisen kann, daß das milchsäurebildende Ferment durch die Dotterhaut zu diffundieren vermag, so ist das im Dotter vorhandene Ferment in das Weißei gelangt und hat dort die Milchsäurebildung aus Traubenzucker verursacht. Diesbezügliche Untersuchungen werden fortgesetzt.

Über die chemische Zusammensetzung der Eischale des Seidenspinners.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Vom morphologischen Standpunkt aus erschien es mir sehr interessant, zu ermitteln, wie die Eischale des Seidenspinners (Bombix mori) chemisch beschaffen sei. In der zoologischen Literatur hört man sehr oft von chitinigen- und chitinartigen Eischalen bei den Wirbellosen sprechen. A. Tichomiroff[1]) hat nun aber festgestellt, daß die Schalensubstanz des Seidenspinners kein Chitin und auch keine chitinartige Substanz ist.

Um weitere Aufschlüsse zu erhalten und ferner die chemische Zusammensetzung der Eischalen des Seidenspinners zu studieren sowie zum Zwecke eines späteren Vergleichs mit der chemischen Zusammensetzung der Seide, habe ich das Studium der Eischalen des Seidenspinners unternommen.

Dabei habe ich, wie allgemein bei Proteinstoffen, die Hydrolyse durch Säuren benutzt. Um die Schalen für die Untersuchung zu reinigen, wurden sie zunächst mit schwacher Salzsäure extrahiert, mit Wasser ausgewaschen, dann zur weiteren Reinigung mehrmals mit 95 proz. Alkohol ausgekocht und endlich mit Äther sowie mit einer Mischung von Äther und Alkohol sorgfältig ausgewaschen.

Hydrolyse der Eischale des Seidenspinners durch Salzsäure und Trennung der Aminosäuren durch ihre Ester.

70 g gereinigte Eischale des Seidenspinners wurde mit 210 ccm konz. Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) übergossen und im Wasser-

[1]) A. Tichomiroff, H. 9, 518.

bade gelöst. Die Flüssigkeit wurde jetzt 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht, wobei die Farbe in Dunkelbraun überging, dann durch ein Koliertuch abgenutscht und der Rückstand mit Wasser gewaschen bis das Waschwasser farblos ablief. Das Filtrat samt dem Waschwasser wurde mit einer größeren Menge Tierkohle aufgekocht, filtriert, unter vermindertem Druck stark eingeengt und in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Die Flüssigkeit blieb dann 3 Tage im Eisschrank stehen, wobei salzsaure Glutaminsäure in Form von dickem Krystallbrei ausfiel. Der Krystallbrei wurde auf der Pumpe abgesaugt und mit kalter konz. Salzsäure ausgewaschen. Das Filtrat samt der Waschflüssigkeit wurde konzentriert und abgekühlt. Dabei krystallisierte noch Chlorhydrat der Glutaminsäure. Diese Operation wiederholte ich unter denselben Bedingungen bis keine Krystalle mehr ausfielen. Die Ausbeute betrug 3,64 g.

0,5320 g Substanz, nach Kjeldahl verbrannt, verbrauchten 29,22 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.

Ber. für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$: 7,63% N; gef. 7,68% N.

Das Filtrat der Glutaminsäure wurde unter vermindertem Druck zu dickem Sirup eingedampft, mit 210 ccm absolutem Alkohol unter Erwärmung gelöst und mit gasförmiger Salzsäure gesättigt. Die abgekühlte Flüssigkeit blieb nach Eintragen eines Krystalles von salzsaurem Glykolester 48 Stunden im Eisschrank stehen, wobei eine reichliche Krystallisation erfolgte. Um das bei der Veresterung sich bildende Wasser möglichst zu entfernen, wurde die alkoholische Mutterlauge wieder im Vakuum zu Sirup eingeengt, mit 210 ccm absolutem Alkohol gelöst und von neuem in der gleichen Art mit Salzsäuregas behandelt. Die gleiche Operation wurde nochmals wiederholt. Die Gesamtausbeute betrug 17,86 g salzsauren Glykokollester, der einen Schmelzpunkt von 144° C zeigte.

0,3520 g Substanz verbrauchten 25,5 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.

Ber. für $C_2H_5NO_2HCl$: 10,03% N; gef. 10,14% N.

Die salzsaure, alkoholische Mutterlauge, die die Ester der übrigen Aminosäuren enthielt, wurde zu Sirup eingeengt. Die weitere Verarbeitung und die Fraktionierung der Aminoester geschah genau nach Angabe von E. Fischer[1]). Bei der Destillation der Ester ergaben sich folgende Fraktionen:

---

[1]) E. Fischer, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151.

a) Destillation bei 12 mm Druck:

1. Fraktion bis 60° (Temperatur des Wasserbades) 4,56 g.
2. Fraktion 60—100° (Temperatur des Wasserbades) 9,91 g.

b) Destillation bei 0—0,2 mm Druck:

3. Fraktion bis 100° (Temperatur des Wasserbades) 3,93 g.
4. Fraktion 100—180° (Temperatur des Ölbades) 3,15 g.

Die drei ersten Fraktionen wurden sofort verseift. Beim Abkühlen der dritten verseiften Fraktion fiel 0,23 g Leucin aus.

0,1564 g Substanz verbrauchten 12,09 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.
Ber. für $C_6H_{13}O_2N$: 10,69% N; gef 10,82% N.

Nach Beendigung der Verseifung wurden die drei Fraktionen unter vermindertem Druck vollständig zur Trockne verdampft. Die gewogenen eingedampften Fraktionen wurden nun mit absolutem Alkohol ausgekocht, um das Prolin in Lösung zu bringen. Das Quantum gereinigten Prolins betrug 1,52 g. Es wurde durch Kochen mit überschüssigem, frisch gefälltem Kupferoxyd in das Kupfersalz verwandelt, dann wurde weiter nach E. Fischer[1]) das Gemisch der Kupfersalze zweimal mit absolutem Alkohol ausgekocht, die alkoholische Lösung von dem zurückbleibenden racemischen Salz durch Filtration getrennt und einige Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehengelassen. Hierbei fiel wieder eine kleine Menge racemisches Kupfersalz aus. Nachdem dieses abfiltriert war, wurde die Mutterlauge unter vermindertem Druck stark eingeengt und bei Ausschluß von Feuchtigkeit im Eisschrank mehrere Tage der Krystallisation überlassen. Hierbei schied sich Kupfersalz des aktiven Prolins in dunkelblauen Krystallen ab. Das Kupfersalz des aktiven Prolins wog 0,88 g, das des racemischen 0,30 g.

Analyse des l-Prolinkupfers.

0,3258 g Substanz gaben 0,0886 g CuO.
Ber. für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$. 21,79%; gef. 21,72%.

Analyse des d, l-Prolinkupfers.

0,2065 g lufttrockenes Salz verloren bei 100° 0,0232 g H_2O.
Ber. für $(C_5H_8NO_2)_2Cu + 2\,H_2O$. H_2O 10,99%; gef. 11,28%.

Das getrocknete Salz gab folgende Zahlen:

0,1833 g Substanz lieferten 0,0498 g CuO.
Ber. für $(C_5H_8NO_2)_2Cu$. 21,79%; gef. 21,70%.

---

[1]) E. Fischer und G. Reif, Ann. d. Chemie 363, 122.

Fraktion I.

Der im Alkohol unlösliche Teil enthielt fast ausschließlich Alanin. Er wurde in der bekannten Weise in Kupfersalz übergeführt. Die Menge Kupfersalz betrug 1,82 g.

0,1380 g Substanz lieferten 0,0459 g CuO.
Ber. für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$. 26,52%; gef. 26,63%.

Fraktion II und III.

Der in absolutem Alkohol unlösliche Teil der 2. Fraktion wurde mit der 3. Fraktion zur gemeinsamen Verarbeitung vereinigt. Zur Reinigung sowie zur Trennung von Aminosäuren dienten die Kupfersalze, die in der gewöhnlichen Weise bereitet wurden. Es wurde dann mit konzentriertem Methylalkohol erschöpfend extrahiert. Die methylalkoholischen Auszüge wurden vom Alkohol befreit und lieferten 1,06 g Kupfersalze. Aus dem in Methylalkohol unlöslichen Teil wurden 5,34 g Alanin und 1,96 g Leucinkupfer getrennt gewonnen.

Analyse des Alaninkupfers:

0,1532 g Substanz lieferten 0,0509 g CuO.
Ber. für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$. 26,52%; gef. 26,50%.

Analyse des Leucinkupfers:

0,2441 g Substanz gaben 0,0603 g CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$. 19,63%; gef. 19,70%.

Die regenerierten freien Aminosäuren aus den methylalkohollöslichen Kupfersalzen, die wesentlich aus Valin und Isoleucinkupfer bestehen mußten, wurden[1]) mit Barytwasser im Autoklaven bei 180° racemisiert, die nach Entfernung des Baryts wiedergewonnenen Aminosäuren in die Kupfersalze verwandelt und die Mischung der Kupfersalze mit Äthylalkohol behandelt, wobei das Kupfersalz des Isoleucins in Lösung ging und das des racemischen Valins rein zurückblieb (0,5 g).

0,1429 g Substanz lieferten 0,0388 g CuO.
Ber. für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$. 21,49%; gef. 21,68%.

Die alkohollöslichen Auszüge wurden vom Alkohol befreit. Der Rückstand lieferte 0,36 g Kupfersalze.

0,1816 g Substanz ergaben 0,0452 g CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$. 19,63%; gef. 19,87%.

---

[1]) F. Ehrlich und A. Wendel, diese Zeitschr. 8, 399.

Fraktion IV.

Zunächst wurde der Phenylalaninester durch Ausäthern von den übrigen Aminosäureestern getrennt. Der Äther wurde abdestilliert und der Rückstand durch Abdampfen mit rauchender Salzsäure verseift. Das gereinigte salzsaure Phenylalanin wog 0,5946 g.

0,2085 g Substanz verbrauchten 10,5 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.
Ber. für $C_9H_{11}O_2N \cdot HCl$: 6,94% N; gef. 7,05% N.

Die von Phenylalaninester getrennte wässerige Lösung wurde durch Kochen mit Baryt verseift; nach mehreren Tagen wurden die abgeschiedenen Krystalle abfiltriert und mit 25 proz. Schwefelsäure versetzt. Durch Kochen des Gemisches wurde die Asparaginsäure in Freiheit gesetzt, von der 0,26 g erhalten wurden.

0,1028 g Substanz verbrauchten 7,65 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.
Ber. für $C_4H_7O_4N$: 10,52% N; gef. 10,41% N.

Das Filtrat vom asparaginsauren Baryt wurde mit Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit und die Lösung nunmehr unter vermindertem Druck eingeengt. Es krystallisierte keine Asparaginsäure mehr aus. Aus der Mutterlauge bekam ich 0,77 g Serin. Es wurde als β-Naphthalinsulfoderivat gereinigt.

0,3105 g Substanz verbrauchten 10,63 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.
Ber. für $C_{13}H_{13}O_5NS$: 4,74% N; gef. 4,79% N.

Darstellung von Tyrosin. 21 g Material wurde 6 Stunden mit 60 ccm rauchender Salzsäure am Rückflußkühler gekocht und dann die Hydrolysenflüssigkeit sofort unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 30 ccm Wasser aufgenommen und wiederum eingedampft. Zur möglichst weitgehenden Entfernung der Salzsäure wurde dieser Prozeß nochmals wiederholt. Schließlich wurde der Rückstand in 100 ccm Wasser gelöst, mit Tierkohle kräftig gekocht und dann filtriert. Die abfiltrierte Tierkohle wurde mit siedend heißem Wasser ausgewaschen, bis eine Probe des Filtrates keine Reaktion mit Millons Reagens mehr ergab. Nun wurde die gesamte Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einem aliquoten Teil der Lösung wurde der Säuregehalt titrimetrisch bestimmt. Durch Zugabe der berechneten Menge von Natronlauge neutralisierte ich die Salzsäure. Es fiel sofort ein dichter Niederschlag. Die Krystallisation wurde solange wiederholt, als die jeweilige Mutterlauge noch eine Reaktion auf Tyrosin zeigte. Die vereinigten Krystall-

massen wurden aus heißem Wasser umgelöst. Die Ausbeute an Tyrosin betrug 2,35 g.

0,3865 g Substanz verbrauchten 21,45 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.
Ber. für $C_9H_{11}O_3N$: 7,74% N; gef. 7,76% N.

Trennung der Hexonbasen.

25 g des zu untersuchenden Materials wurden mit einer Mischung von dreifachem Gewicht konzentrierter Schwefelsäure und dem sechsfachen Gewicht Wasser 14 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Die Flüssigkeit wurde dann unter vermindertem Druck eingeengt und mit Bariumcarbonat bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Der entstandene Niederschlag von schwefelsaurem Baryt wurde abgesaugt, wiederholt ausgekocht und bis zum Ausbleiben jeder Fällung durch Phosphorwolframsäure sorgfältig heiß ausgewaschen. Die Lösung wurde auf etwa 50 ccm eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% H_2SO_4 betrug, und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde sodann durch Baryt zerlegt, das unlösliche Bariumsalz abgesaugt, mehrfach ausgekocht und mit heißem Wasser ausgewaschen. Der überschüssige Baryt, der mit den Waschwassern vereinigten Filtrate wurde mit einem kleinen Überschuß von Schwefelsäure entfernt. Die nunmehr erhaltene schwefelsaure Flüssigkeit wurde in einen geräumigen Kolben gebracht und auf dem Wasserbade erwärmt. Nun wurde unter ständigem Schütteln fein gepulvertes Silbersulfat in kleinen Portionen zugesetzt, und zwar so lange, bis eine Probe der Lösung mit Barytwasser eine gelbe Färbung ergab. Nun wurde die Flüssigkeit auf 40° abgekühlt und mit Baryt gesättigt. Der entstandene Niederschlag wurde abgenutscht, in einer Reibschale mit Barytwasser zerrieben und nochmals abgenutscht und mit Barytwasser gewaschen. Der Niederschlag wurde nach A und B und die abgenutschte Flüssigkeit nach C behandelt.

A. Bestimmung des Histidins. Die obenerwähnte Silberbarytfällung wurde in schwefelsäurehaltigem Wasser aufgeschwemt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt; aus dem Filtrat vom Silbersulfid wurde der Schwefelwasserstoff unter Durchleiten von Luft vertrieben. Die Flüssigkeit wurde hierauf soweit eingeengt, daß der Schwefelsäuregehalt 2,5% betrug, und mit einem nicht zu reichlichen Überschuß von Quecksilbersulfat gefällt. Der Nieder-

schlag blieb bis zum nächsten Tage stehen, wurde sodann abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Filtrat und Waschwasser wurden vereinigt und zur Argininbestimmung reserviert.

Der Niederschlag wurde in Wasser zerteilt und mit H_2S zerlegt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrierte und durch Eindampfen vom Schwefelwasserstoff befreite Flüssigkeit wurde mit Barytwasser von Schwefelsäure und durch Kohlensäure vom Überschuß des Baryts befreit und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in siedendem Wasser aufgenommen, vom Bariumcarbonat abfiltriert und unter Zusatz von Salzsäure eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser gelöst und mit einer alkoholischen Lösung von Pikrolonsäure versetzt. Daraus konnte ein wenig Histidin als Pikrolonat, das eine schöne Farbenreaktion nach P. Ehrlich und Burian zeigte, abgeschieden werden; aber ihrer zu kleinen Menge wegen konnte die Substanz nicht analysiert werden.

B. Bestimmung des Arginins. Aus dem histidinfreien Filtrat wurde das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff und der Schwefelwasserstoff unter Durchleitung von Luft entfernt, mit Barytwasser von Schwefelsäure und durch Kohlensäure vom Überschuß des Baryts befreit. Jetzt wurde die Flüssigkeit eingedampft, vom abgeschiedenen Baryt abfiltriert, wieder eingedampft und aus dieser eingeengten Lösung das Arginin als Pikrat ausgeschieden (0,12 g). Das Pikrat stellte lange seidenglänzende goldgelbe Nadeln dar und schmolz bei 205°.

0,0934 g Substanz ergaben 20,0 ccm N (20° und 755,3 mm).
Ber. für $C_6H_{14}O_2N_4C_6H_3O_7N_3$: 24,32% N; gef. 24,19% N.

C. Bestimmung des Lysins. Das Filtrat der obenerwähnten, Histidin und Arginin enthaltenden Silberfällung wurde mit Schwefelsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreit und nach dem Einengen auf ein kleineres Volumen gebracht, sodann mit einem Zusatz von so viel Schwefelsäure, daß die Lösung 5% davon enthielt, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abgenutscht und in einer Reibschale mit Baryt zerrieben. Vom Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat durch Schwefelsäure genau vom überschüssigen Baryt befreit, und das Filtrat vom Bariumsulfat unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde mit Alkohol erschöpft, und aus der alkoholischen Lösung wurde das

Lysin unter Zusatz einer alkoholischen Pikrinsäurelösung als Pikrat isoliert (0,25 g).

Die aus dem Wasser umkrystallisierte Substanz ergab folgende Analysenzahlen:

0,1726 g Substanz lieferten 28,3 ccm N (23,2° und 754,7 mm).
Ber. für $C_6H_{14}O_2N_2C_6H_3O_7N_3$: 18,67% N; gef. 18,23% N.

Die Gesamtmenge der aus der Eischale des Seidenspinners isolierten Aminosäuren ist in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.

Glykokoll	13,72%	Glutaminsäure	4,16%
Alanin	3,80%	Serin	1,10%
Valin	0,28%	Cystin	0 %
Leucin	1,46%	Tyrosin	11,19%
Isoleucin	0,20%	Arginin	0,19%
Prolin	2,17%	Histidin	vorhanden
Phenylalanin	0,69%	Lysin	0,39%
Asparaginsäure	0,37%		

Über die Methylierung im tierischen Organismus. I.

Über die Methylierung des Pyridins im Organismus des Kaninchens.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

W. His[1]) stellte zum erstenmal fest, daß das Pyridin im Organismus des Hundes eine Methylengruppe aus unbekannten Gewebsbestandteilen aufnimmt und als Methylpyridylammoniumhydroxyd in den Harn übergeht. Rudolf Cohn[2]) konnte diese Beobachtung bestätigen und F. Hofmeister[3]) erweiterte diese Beobachtung durch die Feststellung, daß nach Eingabe von Selen und Tellur im Harne entsprechende Methylverbindungen auftreten. In Übereinstimmung mit der Beobachtung von His am Hunde haben Untersuchungen von Z. Hoshiai und G. Totani[4]) ergeben, daß nach Verabreichung von Pyridin an Hühner, Ziegen und Schweine Methylpyridylammoniumhydroxyd im Harne auftritt. K. Mayeda und M. Ogata[5]) haben durch einige Versuche feststellen können, daß auch der Organismus des Frosches befähigt ist, die Methylierung des zugeführten Pyridins auszuführen. Andererseits haben nun Abderhalden und Mitarbeiter[6]) behauptet, daß im Gegensatz zum Hunde das Kaninchen nicht befähigt sei, das aufgenommene Pyridin in die Methylverbindung überzuführen, auch dann nicht, wenn es längere Zeit mit Fleisch resp. Milch ernährt wird.

---

[1]) W. His, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **22**, 253.
[2]) Rudolf Cohn, Zeitschr. f. physiol. Chemie **18**, 112.
[3]) F. Hofmeister, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **33**, 198.
[4]) Z. Hoshiai, Zeitschr. f. physiol. Chemie **62**, 118. — Z. Hoshiai und G. Totani, ebenda **68**, 83.
[5]) K. Mayeda und M. Ogata, ebenda **89**, 251.
[6]) E. Abderhalden und Mitarbeiter, ebenda **59**, 32 u. **62**, 133.

Die Richtigkeit dieser Annahme Abderhaldens vorausgesetzt, wäre es sehr merkwürdig, daß nur das Kaninchen, in dessen Harne das Ammoniak in sehr geringer Menge im Vergleich zu anderen Tierarten ausgeschieden wird, Pyridin nicht zu methylieren vermöge. Ich erinnere mich der Versuche, die von Walter[1]) und Winterberg[2]) ausgeführt wurden. Walters Experimente zeigten, daß Hunde auch gegen solche Säuremengen immun sind, die, auf das Kilo Tier berechnet, bei Kaninchen sicher den letalen Ausgang herbeiführen, während im Organismus des Kaninchens in keinem Falle die aufgenommenen Säuren durch Ammoniak neutralisiert werden. Im Gegensatz dazu hat Winterberg behauptet, daß sowohl dem Carnivoren als dem Pflanzenfresser säureneutralisierendes Ammoniak zur Verfügung stände, und wenn auch ein quantitativer Unterschied zugunsten der Carnivoren bestehe, im Prinzipe die chemische Organisation beider Tiergruppen nicht verschieden sei.

Durch diese Arbeiten angeregt, habe ich mir die Frage vorgelegt, ob die angebliche Differenz im Methylierungsvermögen bei Kaninchen und den anderen Tierarten nicht, wie man bisher geglaubt hat, qualitativer, sondern nur quantitativer Natur sei.

Zur Entscheidung dieser Frage wurden zuerst einige Versuche an Kaninchen angestellt, deren Resultate im folgenden mitgeteilt werden.

1. Versuchsreihe.

5 Kaninchen, die auf Karenz gesetzt waren, wurden mit je 0,5 g Pyridin täglich als essigsaures Salz in 10proz. Lösung subcutan injiziert. Der Harn wurde mit neutralem essigsauren Blei im Überschuß gefällt, nach Absetzen des Niederschlages von diesem abgegossen, durch Zusatz von basisch essigsaurem Blei und Ammoniak von neuem ausgefällt und filtriert. Das Filtrat wurde durch Schwefelsäure vom Blei befreit, filtriert, dann unter vermindertem Druck eingeengt und mit Kaliumquecksilberjodidlösung versetzt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag auf dem Filter gesammelt und sorgfältig ausgewaschen. Die einzelnen Portionen des Niederschlages wurden vereinigt und unter Zusatz von Schwefelsäure durch Silberoxyd zerlegt. Nach Abfiltrieren vom Jodsilber wurde das Filtrat durch Barytwasser von überschüssiger Schwefel-

[1]) F. Walter, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 7, 148.

[2]) H. Winterberg, H. 25, 202.

säure und Silbersulfat befreit, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und Erwärmen entfernt und die wässerige Lösung mit Salzsäure genau neutralisiert. Jetzt wurde die Lösung unter vermindertem Druck eingedampft und mit Alkohol ausgezogen. Aus der alkoholischen Lösung wurde mittels Platinchlorid das Doppelsalz der Base isoliert.

Die Resultate sind in Tabelle I zusammengestellt.

Tabelle I.

Kaninchen A.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
10. I.	2285	—	—	—		erster Hungertag
11. I.	—	0,5	—	—		
12. I,	—	0,5	200	alkalisch	—	
13. I.	—	0,5	40	sauer	—	
14. I.	—	0,5	20	"	—	
15. I.	—	0,5	55	"	+	
16. I.	1675	—	20	"	—	†
	Summe	2,5	335			

Kaninchen B.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
10. I.	2515	—	—	—		erster Hungertag
11. I.	—	0.5	—	—		
12. I.	—	0,5	280	alkalisch	—	
13. I.	—	0,5	40	sauer	—	
14. I.	—	0,5	40	"	—	
15. I.	—	0,5	40	"	—	
16. I.	—	0,5	55	"	+	
17. I.	1820	—	15	"	+	†
	Summe	3,0	470			

Kaninchen C.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
18. I.	2482	0,5	—	—		erster Hungertag
19. I.	—	0,5	65	sauer	—	
20. I.	—	0,5	95	"	—	
21. I.	—	0,5	82	"	—	
22. I.	—	0,5	85	"	+	
23. I.	—	0,5	70	"	+	
24. I.	1865	—	30	"	+	†
	Summe	3,0	427			

Kaninchen D.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
23. I.	3205	0,5	—	—		erster Hungertag
24. I.	—	0,5	—	—		
25. I.	—	0,5	95	sauer	—	
26. I.	—	0,5	50	"	—	
27. I.	—	0,5	30	"	—	
28. I.	—	0,5	45	"	—	
29. I.	—	0,5	30	"	+	
30. I.	—	0,5	30	"	+	
31. I.	—	—	20	alkalisch	+	
1. II.	2290	—	20	"	+	†
	Summe	4,0	320			

Kaninchen E.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
27. I.	2310	0,5	—	—		erster Hungertag
28. I.	—	0,5	90	sauer	—	
29. I.	—	0,5	60	"	—	
30. I.	—	0,5	65	"	—	
31. I.	—	0,5	85	"	—	
1. II.	1850	—	50	neutral	+	†
	Summe	2,5	350			

Im ganzen wurden 15 g Pyridin verfüttert. Das Platinchloriddoppelsalz wurde mit Alkohol und Äther gewaschen und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Nach mehrmaligem Umkrystallisieren erhielt ich die Platinverbindung in Form orangeroter Tafeln; sie wog 0,1134 g.

0,0778 g Substanz gaben 0,0254 g Pt = 32,64%.
Ber. für $(C_6H_7N \cdot HCl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef.: 32,64%.

2. Versuchsreihe.

4 Kaninchen wurden mit gelben und weißen Rüben gefüttert und erhielten je 0,5 g Pyridin täglich als essigsaures Salz in 10 proz. Lösung mittels Schlundsonde. Der Harn wurde auf gleiche Weise wie beim Versuch 1 behandelt. Die Ergebnisse gehen aus folgender Übersicht hervor.

Tabelle II.

Kaninchen A.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn: Menge in ccm	Harn: Reaktion	Harn: Geruch nach Pyridin	Bemerkungen
3. III.	2510	0,5	—	—		
4. III.	—	0,5	—	—		
5. III.	—	0,5	160	alkalisch	—	
6. III.	—	0,5	30	neutral	—	
7. III.	—	0,5	50	alkalisch	—	
8. III.	2440	—	60	"	+	Diarrhöe
Summe		2,5	300			

Kaninchen B.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn: Menge in ccm	Harn: Reaktion	Harn: Geruch nach Pyridin	Bemerkungen
3. III.	2025	0,5	—	—		
4. III.	—	0,5	100	alkalisch	—	
5. III.	—	0,5	—	—		
6. III.	—	0,5	115	neutral	—	
7. III.	—	—	75	"	—	Diarrhöe
8. III.	—	—	—	—		
9. III.	1910	—	160	alkalisch	+	
Summe		2,0	450			

Kaninchen C.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn: Menge in ccm	Harn: Reaktion	Harn: Geruch nach Pyridin	Bemerkungen
11. III.	2240	0,5	—	—		
12. III.	—	0,5	110	alkalisch	—	
13. III.	—	0,5	90	"	—	
14. III.	—	0,5	90	"	—	
15. III.	—	0,5	130	"	—	
16. III.	—	—	140	"	—	
17. III.	2070	—	210	"	+	
Summe		2,5	770			

Kaninchen D.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn: Menge in ccm	Harn: Reaktion	Harn: Geruch nach Pyridin	Bemerkungen
11. III.	2190	0,5	—	—		
12. III.	—	0,5	200	alkalisch	—	
13. III.	—	0,5	290	"	—	
14. III.	—	0,5	160	"	—	
15. III.	—	0,5	320	"	+	
16. III.	—	—	150	neutral	+	Diarrhöe
17. III.	2140	—	90	"	+	
Summe		2,5	1210			

Im ganzen wurden 9,5 g Pyridin verfüttert. Die Menge Platinchloriddoppelsalz betrug 0,0650 g.

0,0562 g Substanz gaben 0,0182 g Pt = 32,38%.
Ber. für $(C_5H_7N \cdot HCl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef.: 32,38%.

3. Versuchsreihe.

Ein Kaninchen wurde mit gelben und weißen Rüben gefüttert; ihm wurden 0,5 g Pyridin täglich als essigsaures Salz in 10proz. Lösung subcutan injiziert. Der Harn wurde auf gleiche Weise wie beim Versuch 1 behandelt. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Resultate.

Tabelle III.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
17. IV.	2995	0,5	—	—		
18. IV.	—	0,5	290	alkalisch	—	
19. IV.	3000	0,5	293	"	—	
20. IV.	—	0,5	420	"	+	
21. IV.	—	—	180	"	+	
22. IV.	—	—	420	"	—	
23. IV.	—	0,5	330	"	—	
24. IV.	—	0,5	217	"	—	
25. IV.	—	—	245	"	—	
26. IV.	—	0,5	298	"	—	
27. IV.	3030	0,5	180	"	—	
28. IV.	—	0,5	260	"	+	
29. IV.	—	—	190	"	+	
30. IV.	—	—	195	"	+	
1. V.	—	0,5	205	"	—	
2. V.	—	0,5	358	"	—	
3. V.	3035	0,5	170	"	—	
4. V.	—	—	287	"	+	
5. V.	3010	—	250	"	+	
Summe		6,0	4788			

Im ganzen wurden 6,0 g Pyridin verfüttert. Das Platinchloriddoppelsalz betrug 0,0516 g.

0,0516 g Substanz gaben 0,0168 g Pt = 32,55%.
Ber. für $(C_5H_7N \cdot HCl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef.: 32,55%.

4. Versuchsreihe.

Ein Kaninchen, das mit Tofukara gefüttert war, erhielt 0,5 g Pyridin täglich als essigsaures Salz in 10proz. Lösung subcutan injiziert. Folgendes Verhalten ist zu verzeichnen.

Tabelle IV.

Datum 1918	Körpergewicht in g	Zugeführtes Pyridin in g	Harn			Bemerkungen
			Menge in ccm	Reaktion	Geruch nach Pyridin	
17. IV.	2350	0,5	—	—		
18. IV.	—	0,5	175	alkalisch	—	
19. IV.	—	0,5	90	"	—	
20. IV.	2305	—	210	"	—	
21. IV.	—	—	182	"	—	
22. IV.	—	0,5	105	"	—	
23. IV.	—	0,5	133	"	—	
24. IV.	2290	0,5	208	"	+	
25. IV.	—	0,5	120	"	+	
26. IV.	—	—	224	"	+	
27. IV.	—	—	160	"	—	
28. IV.	—	0,5	175	"	—	
29. IV.	—	—	210	"	—	
30. IV.	2295	—	98	"	—	
	Summe	4,0	2090			

Im ganzen wurden 4,0 g Pyridin verfüttert. An Platinchloriddoppelsalz bekam ich 0,0362 g.

Sie ergaben 0,0117 g = 32,32% Pt, statt der berechneten 32,74%.

Aus den dargestellten Untersuchungen kann man als sicher feststellen, daß im Gegensatz zur Annahme Abderhaldens das Kaninchen befähigt ist, wenn auch in geringerer Menge, verfüttertes Pyridin in die Methylverbindung überzuführen, und zwar bei Rüben- wie bei Tofukarafütterung, sowie nach längerem Hungern.

Über die Methylierung im tierischen Organismus. II.

Über den Ort der Methylierung des Pyridins im tierischen Organismus.

Von

Masaji Tomita.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kioto, Japan.)

(Eingegangen am 24. Januar 1921.)

Seit der Feststellung von W. His[1]), wonach verabfolgtes Pyridin als Methylpyridylammoniumhydroxyd zur Ausscheidung gelangt, haben andere Untersuchungen ergeben, daß einige Substanzen nach ihrem Durchgang durch den Organismus in Form solcher methylierten Verbindungen im Harn auftreten. So zum Beispiel kann im Stoffwechsel aus telluriger und seleniger Säure, wie F. Hofmeister[2]) beobachtet hat, Tellur- bzw. Selenmethyl, aus Diäthylsulfid nach Neuberg und Grosser[3]) Diäthylmethylsulfiniumhydroxyd entstehen. Hierhin gehört ferner, wie Neuberg und Salomon[4]) fanden, die Bildung des Heteroxanthins im Hundeorganismus.

Die Frage, an welchem Ort im Tierkörper die Methylierung vollzogen wird, hat seit langem das Interesse der Physiologen in Anspruch genommen. Bis jetzt sind aber in dieser Richtung äußerst spärliche Arbeiten ausgeführt worden. Hofmeister war es, der bestimmte drüsige Organe, vor allem die Hoden, als die Organe bezeichnet hat, in denen aus telluriger Säure und auch aus seleniger Säure die Hauptmasse des Tellurmethyls und Selenmethyls entstünde. Leider beruhen die experimentellen Grund-

---

1) W. His, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 22, 253.

2) F. Hofmeister, ebenda 33, 198.

3) C. Neuberg und Grosser, Zentralbl. f. Physiol. 19, 316.

4) C. Neuberg und G. Salomon, Festschr. f. E. Salkowski, Berlin 1904, S. 37.

lagen der Hofmeisterschen Anschauungen lediglich auf einer Geruchsreaktion, was die Sicherheit der Beweisführung zumindest sehr beeinträchtigt. Um die Kenntnis vom Ort und der Bedingung der Methylsynthese des Pyridins zu fördern, habe ich einige Versuche an Fröschen und Hunden angestellt, deren Resultate im folgenden mitgeteilt werden sollen.

I. Versuch an Fröschen.

Es ist schon im hiesigen Institut durch Experimente von K. Mayeda und M. Ogata[1]) mit Sicherheit festgestellt, daß der Organismus des Frosches befähigt ist, die Methylierung des zugeführten Pyridins auszuführen.

Versuch 1: 25. X. 1916. 50 Fröschen wurde je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan injiziert. Die Menge des 24stündigen Harns betrug 85 ccm. Der Urin wurde genau nach Angabe von His auf Methylpyridylammoniumhydroxyd verarbeitet. Es wurden erhalten: 0,0390 g Platinchloriddoppelsalz.

0,0390 g Substanz gaben 0,0127 g Pt = 32,56%.
Ber. für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef. 32,56%.

Versuch 2: 2. XI. 1916. 48 Frösche erhielten nach der Milzexstirpation je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan. Diese lieferten nach 24 Stunden 59 ccm Harn. Daraus wurden dargestellt: 0,0096 g Platinchloriddoppelsalz.

Versuch 3: 4. XI. 1916. 43 milzlose Frösche erhielten je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan eingespritzt. Aus 46 ccm Harn wurden dargestellt: 0,0115 g Platinchloriddoppelsalz.

Versuch 4: 7. XI. 1916. 35 milzlosen Fröschen wurde je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan injiziert. Aus 32 ccm Harn wurden dargestellt: 0,0078 g Platinchloriddoppelsalz.

Die einzelnen Portionen des Platinchloriddoppelsalzes bei der Milzexstirpation wurden vereinigt und lieferten nach der Umkrystallisation bei der Analyse die folgenden Werte.

0,0258 g Substanz gaben 0,0084 g Pt = 32,55%.
Ber. für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef.: 32,55%.

Versuch 5: 10. XI. 1916. 26 Fröschen wurde nach der Pankreasexstirpation je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan beigebracht. Aus 20 ccm des 24stündigen Harns wurden dargestellt: 0,0108 g Platinchloriddoppelsalz.

Versuch 6: 15. XI. 1916. 35 Fröschen, denen das Pankreas exstirpiert war, wurde je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan appliziert.

[1]) K. Mayeda und M. Ogata, Zeitschr. f. physiol. Chemie 89, 251.

Aus 29 ccm des 24stündigen Harns wurden dargestellt: 0,0152 g Platinchloriddoppelsalz.

Versuch 7: 18. XI. 1916. 25 pankreaslose Frösche erhielten je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan. Aus 21 ccm Harn wurden dargestellt: 0,0110 g Platinchloriddoppelsalz.

Die einzelnen Portionen des Platinchloriddoppelsalzes bei der Pankreasexstirpation wurden wiederum vereinigt und aus heißem Wasser umkrystallisiert. Dieses Salz schmolz bei 207° und glich nach Löslichkeit und Krystallform dem Methylpyridylammoniumhydroxyd.

0,0328 g Substanz gaben 0,0106 g Pt = 32,31%.
Ber. für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$: Pt = 32,74%; gef.: 32,31%.

Versuch 8: 22. XI. 1916. 30 Frösche, denen zuvor die Leber exstirpiert war, wurden mit je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz behandelt. Aus 18 ccm des 24stündigen Harns konnte ich kein Platinchloriddoppelsalz gewinnen.

Versuch 9: 3. XII. 1916. 25 Frösche erhielten nach der Leberexstirpation je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan. Aus 15 ccm Harn, den die Tiere 24 Stunden nach der Pyridininjektion geliefert hatten, wurde kein Platinchloriddoppelsalz dargestellt.

Versuch 10: 8. XII. 1916. 30 entleberten Fröschen wird je 0,05 g Pyridin als essigsaures Salz subcutan injiziert. Aus 20 ccm 24stündigen Harns wurde kein Platinchloriddoppelsalz erzielt.

Zusammenfassend glaube ich also aus meinen Versuchen folgern zu können, daß der Frosch befähigt ist, die Methylierung des zugeführten Pyridins auszuführen, wenn er von der Milz oder vom Pankreas befreit wird, während sich bei der Leberexstirpation kein Methylpyridin bildet.

II. Versuch am Hunde.

Versuch 11: Am 10. XI. 1917 wurde einem Hunde von 16 kg Körpergewicht die Milz exstirpiert. Seit dem 15. XII. 1917 wurden dem Hund täglich 0,25 g Pyridin als essigsaures Salz in 5 proz. Lösung mittels Schlundsonde in den Magen eingeführt. Die Fütterung wurde in derselben Weise 8 Tage lang fortgesetzt. Der Harn wurde in bekannter Art auf Methylpyridylammoniumhydroxyd verarbeitet. Es wurden erhalten:

0,08 g Platinchloriddoppelsalz.
0,0785 g Substanz geben 0,0256 g Pt = 32,61%.
Ber. für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$: Pt 32,74%; gef.: 32,61%.

Versuch 12: Am 20. IX. 1918 wurden einem Hunde von 18 kg Körpergewicht beide Hoden exstirpiert. 4 Tage lang seit dem 30. IX. wurde dem Tier dann täglich 0,5 g Pryidin als essigsaures Salz in 10 proz. Lösung subcutan injiziert. Aus dem 4tägigen Harne wurden 0,36 g Platin-

chloriddoppelsalz erhalten, das in orangeroten Tafeln krystallisierte und bei 207° schmolz.

0,1862 g Substanz gaben 0,0608 g Pt = 32,65%.
Ber. für $(C_5H_5N \cdot CH_3Cl)_2PtCl_4$: Pt 32,74%; gef.: 32,65%.

Durch die mitgeteilten Versuche können die folgenden Tatsachen als erwiesen angesehen werden, erstens, daß beim Hunde die totale Entfernung der beiden Hoden ohne jeglichen Einfluß auf die Methylierung des Pyridins ist und daß der Hund ferner befähigt ist, diese Methylierung bei der Milzexstirpation auszuführen, selbst wenn ein quantitativer Unterschied besteht.

Wenn nun auf diese Weise aus den nach Exstirpation von Milz, Pankreas und Hoden erhaltenen Resultaten sichergestellt ist, daß diese Organe im lebenden Tiere bei der Methylierung des Pyridins keine ausschlaggebende Rolle spielen, so läßt sich im Gegensatz hierzu mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit schließen, daß diese Methylierung im lebenden Tier hauptsächlich in der Leber zustande kommt. Die Aufgabe weiterer Untersuchungen, die zur endgültigen Beantwortung der hier aufgeworfenen Frage betreffs des Methylierungsvermögens der Leber führen können, wird zunächst darin bestehen, die Bedingungen für das Zustandekommen derartiger Vorgänge mit Hilfe isolierter Organe festzustellen. Um nun jene Organe kennenzulernen, in denen sich die Methylierung vollzieht, wären Versuche am überlebenden Organ mit künstlicher Durchblutung besonders erwünscht gewesen. Leider sind alle meine bisherigen Bemühungen, in den Durchblutungsversuchen und auch bei Organbreiversuchen das Methylierungsprodukt in Form der Ammoniumbase zu erhalten, vergeblich gewesen. Dennoch halte ich die aufgewendete Mühe nicht für verloren, da die Einzelheiten der Ausführung für das in Aussicht stehende Resultat von entscheidender Bedeutung sind.

Beeinflussen subminimale Reize den Ablauf chemischer Umsetzungen im isolierten Muskel?

Von

Jakob K. Parnas und **Emilia Laska-Mintz.**

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Warschau*).)

(Eingegangen am 30. Dezember 1920.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

I.

Die mechanische Reaktion des Muskels auf wirksame Reize wird von Wärmebildung und einer Reihe von chemischen Veränderungen begleitet, unter denen die Bildung von Milchsäure und das Verschwinden der Kohlenhydrate besonders hervortreten. Eine Folge der chemischen Veränderungen bilden die elektrischen Erscheinungen. Alle diese Erscheinungen sind eng miteinander verknüpft: es gibt keine Kontraktion ohne Wärmebildung, ohne chemische Veränderungen, ohne elektrische Potentialdifferenzen. Besteht aber die Möglichkeit eines chemischen, thermischen, elektrischen Effektes ohne Muskelkontraktion?

Es unterliegt keinem Zweifel, daß ein ähnlicher Prozeß, der Kohlenhydrate in Milchsäure umsetzt, in ruhenden Muskeln wie auch in tätigen, vorkommt [Fletcher und Hopkins[1]), Fletcher[2]), Meyerhoff[11])] und daß mit diesem Prozeß Wärmebildung verbunden ist [Hill[5])].

Die Geschwindigkeit dieses Prozesses hängt von der Temperatur ab und erreicht in Froschmuskeln bei einer Temperatur von über 30° einen beinahe explosionsartigen Charakter. Fassen wir unsere Frage genauer: Können die chemischen Umsetzungen im intakten Muskel infolge eines Nervenreizes ohne mechanischen Effekt mit einer größeren Geschwindigkeit erfolgen, als

*) Der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Warschau vorgelegt im Oktober 1918.

diejenige, welche bei gegebener Temperatur dem Ruhezustand entsprechen würde?

Dieses Problem wurde bereits untersucht:

Danielewski[4a]) fand, daß man in Froschmuskeln Wärmebildung durch solche Reize hervorrufen kann, welche keine mechanische Reaktion bedingen; doch ist dies in entschiedener Weise von v. Kries und Metzner[5]) und Blix[6]) verneint worden. In den letzten Jahren gelang es Weizsaecker[7]), der sich moderner myothermischer Methoden bediente, die Wärmebildung von dem mechanischen Effekt zu trennen: unter dem Einfluß von Alkohol oder bei höherer Temperatur bildeten die Froschmuskeln Wärme, indem zugleich die mechanische Arbeitsleistung herabgesetzt war.

Gibt es eine solche Trennung unter physiologischen Bedingungen? Können Reize, ohne mechanische Kontraktionen hervorzurufen, chemische Veränderungen im Muskel bewirken?

Diese Frage ist wichtig und zwar nicht nur in Hinsicht auf die allgemeine Muskelphysiologie. Den vorwiegenden Teil der Wärmemenge, die im tierischen Organismus erzeugt wird, entwickeln die Muskeln: die Muskeln sind die wichtigsten wärmeerzeugenden Organe. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die sog. chemische Temperaturregulation, welche die Warmblütler vor der Auskühlung schützt, auf der Muskeltätigkeit beruht: bei curarisierten Tieren ist ihre Wirkung vermindert, bei dem Menschen, der die Fähigkeit besitzt in absoluter Muskelruhe auszuharren (Johansen), fehlt die chemische Regulation.

Wäre es möglich nachzuweisen, daß bestimmte Stärke des Nervenreizes den Stoffwechsel steigert, ohne tetanische Wirkungen hervorzurufen, so hätte man eine wichtige Grundlage für die Lehre von der chemischen Wärmeregulation. Die Wirkung subminimaler Reize auf chemische Vorgänge im Muskel untersuchten im Jahre 1894 R. Heidenhain und sein Schüler E. Gottschlich[8]).

Zu jener Zeit befand sich die Kenntnis der chemischen Vorgänge in den Muskeln in einem ungeklärten Zustand. Es genügt einen Blick auf die ausgezeichnete Zusammenstellung von Joteyko zu werfen (in ihrem Artikel „Fatigue" im Dictionnaire de Physiologie 6, 138; vom Jahre 1904), um sich davon zu überzeugen. Über die Rolle der Säure in den Muskeln bestanden die widersprechendsten Angaben: einige Forscher behaupteten, daß frische Muskeln mehr Säure (bzw. Milchsäure) enthalten als ermüdete Muskeln, — andere waren der entgegengesetzten Meinung.

Heidenhain bediente sich einer Methode, von der wir heute sagen können, daß sie der Wahrheit am nächsten führte. Mittels dieser Methode stellte er fest, daß die Säuerung der Muskeln mit ihrer Tätigkeit zusammenhängt und daß die Ansammlung der Säure in den Muskeln zur Tätigkeit der Muskeln in Beziehung steht, und auch zur Wärmemenge, die von ihnen gebildet wird. Die Methode Heidenhains bestand in einer Extraktion der Muskeln mit gesättigter Kochsalzlösung unter Zusatz von Lackmus

und einer colorimetrischen Bestimmung des Säuregehaltes in ähnlicher Weise wie wir jetzt mit Hilfe einer ganzen Reihe von Indikatoren die Wasserstoffionenkonzentration bestimmen.

Später, im Laufe der Arbeit Gottschlichs, fügte er zum sauren Muskelextrakt alkalische Alezarinlösung hinzu und titrierte sie mit $^{n}/_{100}$-Natronlauge so weit, bis er dieselbe Färbung erreichte, die ein ebenso behandelter Extrakt der Kontrollmuskeln zeigte.

Heidenhain und Gottschlich untersuchten mit Hilfe dieser Methode den Einfluß subminimaler Reize auf das Muskelgewebe. Muskel-Nervenpräparate wurden mit Induktionsströmen gereizt; die Stromstärke (Rollenabstand) blieb immer knapp unterhalb der Schwelle des Minimalreizes. Gottschlich fand, daß eine solche stundenlange Tetanisierung Säurebildung bewirkte: in 1 g Muskel bildete sich 0,18 bis 25 mg Säure. Zwischen den Ergebnissen einzelner Experimente bestanden große Unterschiede. Gottschlich beachtete sie nicht, obgleich er sich der Wichtigkeit seiner Befunde voll bewußt war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen Gottschlichs fanden allgemeine Anerkennung und wurden als Begründung der Lehre von der Wirksamkeit subminimaler Reize aufgefaßt. Seit jener Zeit wurden aber wichtige Fortschritte in der Erforschung der chemischen Vorgänge gemacht, die mit der Muskeltätigkeit zusammenhängen.

Die Arbeit von Fletcher und Hopkins deckte die Fehlerquellen älterer Untersuchungen auf. Sie lehrte uns vor allem isolierte Muskeln richtig zu behandeln; alle Mittel, die man früher anwendete, um Muskelextrakte herzustellen, erwiesen sich als intensive Zersetzungsfaktoren. Lauwarmes und heißes Wasser, Alkohol, Äther- und Chloroformdämpfe, mechanische Zerkleinerung des Gewebes — dies alles bewirkte Milchsäurebildung. Fletcher und Hopkins klärten auch den Einfluß der Atmosphäre auf die chemischen Vorgänge in Muskeln auf. Milchsäure kann sich nur in sauerstoffreier Atmosphäre ansammeln, in Sauerstoff verschwindet die angesammelte. Nachdem die Grundbegriffe eine solche Veränderung erfahren und man Fehler aufgedeckt hatte, von denen keiner der älteren Versuche frei war, mußte man selbst die besten jener Untersuchungen mit gewissem Vorbehalt betrachten.

Zu diesen Untersuchungen gehörten auch diejenigen von Heidenhain und Gottschlich. In Hinsicht auf die Wichtigkeit der behaupteten Tatsachen hielten wir eine Nachprüfung dieser Arbeit für nötig.

Es besteht ein Widerspruch zwischen der Lehre von dem chemischen Effekt subminimaler Reize und einer der schönsten Errungenschaften moderner Muskelphysiologie: dem Gesetz der maximalen Zuckung der Muskelfaser oder dem „Alles oder Nichtsgesetz". Dieses Gesetz, von Bowditsch für die Herzmuskeln aufgestellt, wurde von Keith Lucas[9]) auf die Physiologie der quergestreiften Muskeln erweitert; es besagt, daß die Muskelfaser auf einen Reiz entweder überhaupt nicht oder nur mit einer maximalen Kontraktion reagieren kann. Da die Reize sich über eine große Menge von Muskel- und Nervenfasern ausbreiten, werden Kontraktionsunterschiede durch die Abstufung der Reize von subminimalen bis maxi-

malen hervorgerufen. In Muskeln mit nur geringer Anzahl von Nervenfasern gibt es nur wenige Abstufungen der Kontraktionen (M. dorsocutaneus).

Es scheint mir kaum möglich, die Lehre von der chemischen Wirksamkeit subminimaler Reize mit dem Gesetz von der maximalen Zuckung der Muskelfaser in Einklang zu bringen: man müßte annehmen, daß Reize die Kontraktion weniger Fasern bewirken und daß diese Zuckungen sich mechanisch nicht zu erkennen geben. Die Grundbedingung eines jeden solchen Versuches ist indessen, wie schon Gottschlich betonte, das Fehlen von fibrillären Zuckungen.

Wir unternahmen die Neubearbeitung dieser Frage. Die angewendeten Methoden und ihre Resultate werden hier mitgeteilt.

II.

Ohne unsere Arbeit mit einer Nachprüfung der Versuche Gottschlichs zu beginnen, haben wir die Frage direkt angefaßt.

Eine allgemeine Bestimmung der Acidität der Muskelextrakte müßte zu einem minder exakten und schwerer zu deutenden Ergebnis führen als eine Bestimmung der Milchsäure. Wir wissen heute, daß der Milchsäuregehalt in frischen oder ausgeruhten Muskeln sehr gering ist, er beträgt da weniger als 0,01%. In gereizten Muskeln erreicht er 0,18%; von der allgemeinen Acidität wissen wir nur sehr Widersprechendes. Selbst der Gegenstand des Problems müßte erst definiert werden. Es ist unmöglich, die Konzentration der Wasserstoffionen oder den allgemeinen Säuregehalt eines Gewebes zu bestimmen. Selbst solche Extrakte, bei deren Herstellung der chemische Zustand der Muskeln sozusagen fixiert wurde, bestehen aus einer Mischung von Milchsäure, Laktaten, sauren und basischen Phosphaten, Bicarbonaten und Kohlensäure. Jede Enteiweißung verschiebt das Verhältnis der Säuren und Basen, wenn auch nur durch die Beseitigung von Kohlendioxyd. Man kann also nur die Wasserstoffionenkonzentration in in gleicher Weise hergestellten Extrakten vergleichen, oder auch ihre Fähigkeit Säure oder Alkali zu neutralisieren, d. h. man muß die Basenmenge messen, die den zu vergleichenden Extrakten beigefügt werden muß, um gleiche Wasserstoffionenkonzentration zu erreichen. Es wird jedenfalls schwierig sein, die Neutralisationskraft einer so zusammengesetzten Mischung

von Moderatoren zu deuten; hingegen ergibt eine Bestimmung der Milchsäure sofort ein bestimmtes Resultat. Die Bildung von Milchsäure ist der einzige chemische Vorgang, von dem wir bestimmt wissen, daß er mit Muskelzuckung zusammenhängt.

Die erste Aufgabe besteht in folgendem: den Muskeln Subminimalreize zuzuführen und festzustellen, ob zwischen den so gereizten Muskeln und den ungereizten Kontrollmuskeln ein Unterschied im Milchsäuregehalt besteht.

1. Das Material und seine Vorbereitung.

Wir bedienten uns frischer Sommeresculenten. Gottschlich bemerkt, daß seine Versuche an Winterfröschen mißlangen. Man benützte sorgfältig bereitete Präparate, die aus den beiden M. gastrocnemii mit Nerven und einem Stück Rückenmark bestanden. Über das Präparieren und Töten (nach Ewald) und über die Notwendigkeit, eben dieses Verfahren bei Muskelversuchen anzuwenden, siehe Parnas[4]).

Die Präparate wurden mit Induktionsströmen eines Schlitteninduktionsapparates gereizt, der von einem Wagnerschen Hammer unterbrochen wurde. Die Ströme leitete man zu den Nerven mittels einer Art flüssiger Elektroden nach Lucas.

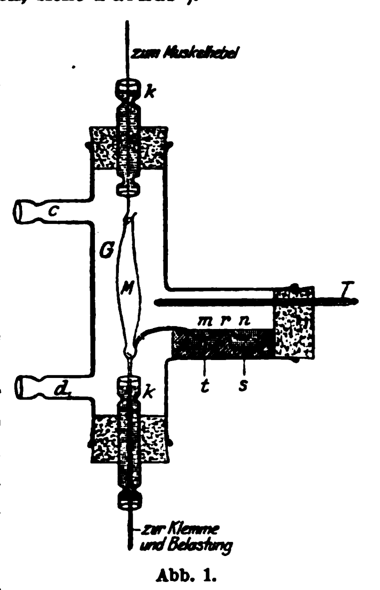


Abb. 1.

Um das Verbrennen der entstehenden Milchsäure zu verhindern, reizte man die Muskeln in Wasserstoff. Auch der Kontrollmuskel befand sich in Wasserstoff. — Wir benützten eine Kammer, welche in der Abbildung 1 und 2 dargestellt wird. Das Rohr (Durchmesser 55 mm, Länge 100 mm) hat einen 55 mm langen Ansatz *A*; an der entgegengesetzten Seite befinden sich die Tubi *c* und *d*. In dem Boden des Ansatzes *A* sind 2 Platindrähtchen im Abstand von 15 mm eingeschmolzen, die bis 10 mm Länge ins Innere des Röhrchens reichen und ebensoweit nach außen ragen. In dem Ansatz befestigte man eine halbzylinderförmige Paraffinbank *P*, welche die untere Hälfte dieses Ansatzes ausfüllte. In die Bank *P* sind Vertiefungen *m* und *n* eingegraben, welche durch die Rinne *r* verbunden werden. Die Platindrähtchen gehen durch die Bank und sind am Boden der Vertiefungen senkrecht abgebogen. Wenn der Nerv in den Vertiefungen *m*, *n* und *r* liegt, *m* und *n* mit Ringerscher Flüssigkeit ausgefüllt sind, *r* hingegen mit Vaselin, dann werden die Ströme durch die mit Watte bedeckten

Drähte *t* und *s* auf breiter Ebene zu den Nerven geleitet und verdichten sich nur im Bereiche von *r* so weit, daß sie als Reiz wirken. Will man in einem doppelten Muskel-Nervenpräparat beide Muskeln gleichartig reizen, so leitet man beide Nerven durch die Rinne *r*, will man aber nur einen Muskel reizen, so leitet man denjenigen Nerv, der nicht gereizt werden soll, aus der Vertiefung auf die Bank und isoliert ihn eventuell mit einem Stückchen Paraffinpapier. Der gereizte Nerv liegt nun in Vaselin in *r*. Den Ansatz *A* schließt ein Kork, in dem ein kleines Thermometer mit einer Skala von 10 bis 25° steckt.

Die Muskeln sind so aufgehängt, daß man ihre isometrischen Zuckungen bei beliebiger Spannung und in beliebiger Atmosphäre aufschreiben kann. Beide Enden der Kammer *C* sind durch Korkstopfen abgeschlossen, durch welche die Röhrchen *i* und *k* durchtreten; jedes dieser Röhrchen verengt sich an der Spitze zu Capillaren und ist mit zähem Vaselin gefüllt. Durch das Vaselin gehen Platindrähte von 0,1 bis 0,2 mm Dicke oder Lamettafäden. In unseren Versuchen, wo nur ein Muskel gereizt werden sollte, ging nur ein Draht durch den oberen Kork zum Spannungsschreiber; an diesem Draht hingen beide Muskeln. Zu anderen Zwecken kann man zwei Drähte benützen und die Zuckungen zweier Muskel gesondert aufzeichnen. Die Knieende der Muskeln waren mittels Platinhäkchen mit zwei Drähtchen verbunden, die durch das mit zähem Vaselin gefüllte untere Röhrchen gingen. Die Drähtchen gingen zwischen den Backen einer Gaskellschen Klammer hindurch und waren mit Gewichten beschwert, welche den Muskeln die konstante Grundspannung erteilten. Durch Öffnung der Klammer konnte man diese Spannung jederzeit wiederherstellen, durch das Schließen der Klammer festlegen. Durch die Tuben *c* und *d* konnte Wasserstoff geleitet werden; wir benützten Wasserstoff, der aus Zink gewonnen und mit Permanganat, Silbernitrat, Natriumhydrosulfit und Wasser gewaschen war. Die Luft in der Kammer wird durch Ringersche Flüssigkeit verdrängt, dann die Ringersche Flüssigkeit durch Wasserstoff. Die äußere Wand der Kammer ist mit Gaze überspannt, über die Gaze fließt Wasser und verleiht der Kammer eine beliebige Temperatur.

2. Milchsäurebestimmung.

Zur Milchsäurebestimmung wenden wir die von Parnas angegebene Modifikation der Methode von von Fürth und Charnass[4]) an: man kann damit einen Milchsäuregehalt von 1 mg bestimmen.

Die abgekühlten Muskeln wurden bei — 10° mit Alkohol zerrieben. Der Extrakt wurde kolliert, filtriert, neutralisiert und verdampft, mit wenig Wasser aufgenommen und mit Ammoniumsulfat gesättigt; auf diese Weise wurden Eiweiß, Fette und Lipoide entfernt. Dem klaren Extrakt wurde die Milchsäure entzogen, indem man ihn 10 mal mit je dem gleichen Volumen reinen Äthers je eine Minute lang energisch schüttelte. Der Äther wurde verdampft. Der Rest wird in Wasser gelöst, mit Calciumcarbonat oder Zinkcarbonat neutralisiert und verdampft. So ist das Material zur Milchsäurebestimmung fertig.

Später gelang es uns, den ganzen Vorgang bedeutend zu vereinfachen.

Zur Muskelextraktion benützten wir nicht Alkohol, der nach Fletcher und Hopkins das einzige auf Muskeln nicht einwirkende Extraktionsmittel ist, sondern eine gesättigte, wässerige Lösung von Ammoniumsulfat. Zerreibt man die Muskeln mit ein wenig Quarzsand in einer auf — 10° abgekühlten Ammoniumsulfatlösung, so werden Eiweiß, Lipoide usw. vollständig gefällt; nach dem Filtrieren erhält man eine klare Lösung, die man sofort mit Äther extrahieren kann.

Wir untersuchten, ob man mittels dieser Methode nicht Milchsäurebildung hervorruft und ob man die Milchsäure, die in den Muskeln enthalten ist, vollständig extrahiert.

Es wurden zwei gleiche Muskel extrahiert, der eine nach der alten Methode mittels Alkohol, der andere mittels Ammoniumsulfat. Um uns zu überzeugen, daß nach der neuen Methode die Milchsäure vollständig extrahiert wird, extrahierte man zwei gleiche Muskeln, den einen nach der neuen, den anderen nach der alten Methode, nachdem man sie wärmestarr gemacht hatte. Schließlich überzeugten wir uns, daß man bei der Extraktion unbedingt bei tiefer Temperatur arbeiten muß.

Tabelle I.

Erhalten Milchsäure in mg auf 1 g Muskeln.

	Mittels des Alkoholextraktes	Mittels des Extraktes $(NH_4)_2SO_4$
frischer Muskeln	0,22	0,18
frischer verletzter Muskeln . .	0,45	0,47
starrer Muskeln	2,45	2,59

Die Extraktion mittels Ammoniumsulfat kommt, was die Exaktheit der Resultate anbetrifft, der Alkoholextraktion gleich.

Bei der Milchsäurebestimmung nach Parnas begegneten wir anfangs gewissen Schwierigkeiten. Wir fanden, daß die Reagenzien sehr rein sein müssen. Anfangs bereitete uns die Schwefelsäure Schwierigkeiten; diese Schwierigkeiten verschwanden, sobald wir reinste Schwefelsäure (Merck pro Analyse) verwendeten.

Die Sulfitlösungen müssen immer frisch und die Behandlung der Flüssigkeit in der Destilliervorlage und der Kontrollflüssigkeit ganz gleich sein. Die Geschwindigkeit, mit der man Milchsäure oxydiert, reguliert man so, daß 10 ccm Permanganatlösung innerhalb 15 Minuten zufließen. Das Sieden darf die Flüssigkeitsmenge im Kolben nicht verändern; unter diesen Bedingungen erhielt man bei der Mengenbestimmung von beiläufig 2 mg Milchsäure 83% Aldehydausbeute, bei Mengen von beiläufig $^1/_2$ mg eine Ausbeute von 92—95%. Es ist überflüssig zu bemerken, daß diese Genauigkeit bei einer Milchsäurebestimmung in 1 g Muskel völlig genügt. Die Differenzen liegen in der dritten Dezimale der Prozente*).

*) Nachdem Meyerhoff (Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 235. 1920) die Parnassche Mikromethode glücklich mit der Ohlsonschen Ausschüttelung

3. Versuche.

A. In der ersten Versuchsgruppe reizten wir die Muskeln durch einzelne Induktionsströme. Gottschlich probierte die Grenze der subminimalen Ströme aus, indem er die Sekundärspule verschob. Sobald er die Stromstärke erreichte, welche minimal reizte, ließ er denselben Reiz auch auf die Kontrollmuskeln wirken. Auf diese Weise wollte er falschen Ergebnissen vorbeugen, welche durch minimale, nicht mehr subminimale Reize hervorgerufen werden könnten. Wir wendeten diese Versuchskorrektion nicht an; um so überzeugender sind unsere negativen Resultate. Der Primärstrom wurde mittels eines Metronom unterbrochen.

Tabelle II.

Versuchsnummer	Datum	Temperatur in °	Muskelgewicht in g	Versuchsdauer	Zahl der Tetani	Milchsäuregehalt in % Gewicht	
						Gereizter Muskel	Kontrollmuskel
4	10. V.	15	1,31	1h 15′	3000	0,0043	0,0071
5	12. V.	15	1,435	1h	2400	0,032	0,0267
6	15. V.	15	1,18	2h 30′	7800	0,0089	0,014

mit Amylalkohol kombiniert hat, bin auch ich zu diesem Verfahren übergegangen: ich extrahiere das Gewebe oder enteiweiße die Flüssigkeit mit schwach saurem, $^n/_{100}$-schwelfesaurem, gesättigtem Amonsulfat, filtriere durch Asbest und extrahiere nunmehr den stärker angesäuerten Auszug mit Amylalkohol, dem ich — nach Ohlson — die Milchsäure durch Alkalicarbonatlösung entziehe. Die Extraktion geschieht in zwei gleichen Stöpselzylindern von je 50 ccm, in welchen man mittels der abgebildeten Vorrichtung, die an die Pumpe angeschlossen ist, die Amylalkoholschicht aus dem einen in den anderen verlustlos und bequem überführen kann; der eine Zylinder enthält den auszuschüttelnden Amonsulfatextrakt, der andere die 4proz. Sodalösung. Nach 5maliger Extraktion wird der Amylalkohol, der in und auf der Sodalösung verbleibt, aus dem Zylinder mit Wasserdampf abgeblasen, was in wenigen Minuten quantitativ erledigt ist und keine Verluste an Milchsäure bedingt. Dann wird in demselben Zylinder neutralisiert, auf 0,5 % H_2SO_4 und 50 ccm gebracht, und der Bestimmung nach Parnas zugeführt.

Abb. 2.

B. In dieser Versuchsgruppe reizten wir mittels tetanischer Reize. Das Induktorium war mit dem Wagnerschen Hammer verbunden und der Strom wurde mittels des Metronom unterbrochen.

Tabelle III.

Versuchsnummer	Datum	Temperatur in °	Muskelgewicht in g	Versuchsdauer	Zahl der Tetani	Milchsäuregehalt in 0% Gewicht	
						Gereizter Muskel	Kontrollmuskel
7	18. V.	17	1,18	1h	2400 · 1/85	0,0072	0,013
8	22. V.	18	1,04	1h	2400 · 1/85	0,022	0,0156
9	25. V.	17	1,26	1h	2400 · 1/85	0,021	0,021
10	27. V.	17	1,09	2 1/2h	4400 · 1/8	0,0078	0,0122

C. Diese ersten zwei Versuchsgruppen dienten zur ersten Orientierung. Da ein positives Ergebnis fehlte, gingen wir zur langandauernden, ununterbrochenen tetanischen Reizung über.

Tabelle IV.

Versuchsnummer	Datum	Temperatur in °	Muskelgewicht in g	Versuchsdauer der subminimalen tetanischen Reizung	Milchsäuregehalt in 0% Gewicht	
					Gereizter Muskel	Kontrollmuskel
11	28. V.	17	1,06	1h	0,037	0,017
12	4. VI.	17	1,28	2 1/2h	0,0267	0,020
13	5. VI.	17	1,775	2 1/2h	0,029	0,030

In diesen Versuchen besteht kein Unterschied zwischen den subminimal und überhaupt nicht gereizten Muskeln. Kleine Differenzen innerhalb der Fehlerquellen der Methode und der Muskelbehandlung schwanken zwischen einem größeren Milchsäuregehalt des gereizten und des ungereizten Muskels. Der Milchsäuregehalt bewegt sich immer innerhalb der Ruhegrenzen und ist weit entfernt von denen, die wir in tätigen Muskeln finden. Besonders überzeugend sind die Versuche vom 4. VI. und 5. VII., wo wir nach einer 2 1/2stündigen ununterbrochenen tetanischen Reizung ganz gleichen Milchsäuregehalt gefunden haben. Diese Versuche wurden an frischen gefangenen Esculenten schon nach der Laichzeit ausgeführt.

III.

Wenn wir die Versuche Gottschlichs direkter nachprüfen sollten, so müssen wir uns über die Reaktion und Neutralisierfähigkeit der Muskelextrakte orientieren.

Die ältere Literatur enthält darüber die widersprechendsten Angaben. In den letzten Jahren haben Michaelis und Kramsztyk[19]) diesem Problem eine Untersuchung gewidmet; sie beschäftigten sich aber nur mit Bestimmung der Wasserstoffzahl in Muskelextrakten. Da in Moderatorenlösungen die Wasserstoffionenkonzentration infolge Verdünnung nicht verändert wird, so kann man auf Grund einer ($H^{\cdot}$)-Bestimmung in einem wässerigen Muskelextrakt das ($H^{\cdot}$) in dem Gewebe schätzen; darauf beruht die Methode von Michaelis und Kramsztyk. In Extrakten aus Muskeln, die in rohem Zustand zerschnitten und zerrieben und während einer halben Stunde mit destilliertem Wasser geschüttelt wurden, fanden sie mittels der elektrometrischen Methode $H = 10^{-6,02}$; dies entspricht einem stark gesäuerten Muskel. In Muskeln, die sofort nach dem Herausnehmen in heißes Wasser geworfen wurden, fanden sie $[H^{\cdot}] = 10^{-6,91}$. Dieser Gehalt nähert sich nach Michaelis und Kramsztyk am ehesten der wirklichen Wasserstoffionenkonzentration in frischen Muskeln

Die Bestimmungen von Michaelis und Kramsztyk enthalten zwei Fehlerquellen: die eine, die gegenwärtig nicht vermieden werden kann, liegt in dem Verlust von Kohlendioxyd: dadurch liegen die Werte mehr nach der alkalischen Seite. Die zweite läßt sich vermeiden: sie liegt in der Bereitung der Extrakte. Das Kochen der Muskeln schließt Milchsäurebildung nicht aus: dies wurde von Fletcher und Hopkins nachgewiesen. Wir bemühten uns diesen Fehler zu vermeiden, indem wir die Extrakte aus frischen gekühlten Muskeln mittels kalten Alkohols bereiteten. Diese Extrakte befreiten wir von Alkohol durch unvollständige Verdampfung, Aufnahme mit Wasser, Zentrifugieren und Filtrieren.

Da die Lösungen weder Eiweiß noch größere Salzmengen enthielten, so konnte es keine Bedenken gegen die Anwendung der Indikatorenmethode geben. In den Grenzen der Wasserstoffionenkonzentration, die frischen Muskeln entsprachen, eignete sich Naphthophthalein am besten. Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration in Extrakten von wärmestarren Muskeln benützten wir als Indikator Nitrophenol. Die colorimetrischen Messungen wurden in dem Gestell ausgeführt, welches für die quantitative Ammoniakbestimmung mit dem Nesslerschen Reagenz dient. Im frischen Muskelextrakt bei Zimmertemperatur (17°) fanden wir die Wasserstoffionenkonzentration (H) $= 10^{-7,6}$.

Dieser Wert ist sicherlich alkalischer als der physiologische Wert.

Im Muskelextrakt bei Wärmestarre fanden wir $(H^{\cdot}) = 10^{-6,5}$. Unsere Werte sind alkalischer als die von Michaelis und Kramsztyk; aber die Wasserstoffionenkonzentration in frischen Muskeln verhält sich zu derjenigen in gesäuerten Muskeln ebenso wie in den Versuchen von Michaelis. Wir versuchten den Säuregehalt, den man beim Titrieren der Muskelextrakte bestimmte, mit dem Milchsäuregehalt zu vergleichen. Ein solcher Versuch könnte zeigen, ob die Milchsäure die einzige saure Substanz ist, deren Entstehung mit der Muskeltätigkeit oder mit verwandten Zersetzungsvorgängen zusammenhängt. Wir bereiteten Extrakte aus frischen und wärmestarren Muskeln in der angegebenen Weise und titrierten sie mit $^{n}/_{100}$-Natronlauge bis zur gleichen Färbung des Naphtophthaleins; es wurde genau auf gleiche Färbung geachtet. Wir teilen hier die Resultate nicht mit, sie sollen noch genauer untersucht werden; die Differenzen im Säuregehalt waren manchmal mit dem Milchsäuregehalt übereinstimmend, in anderen Versuchen war die Differenz im Säuregehalt geringer, aber niemals größer als der Milchsäuregehalt.

Die Versuche Gottschlichs haben wir nicht nachgeprüft; beim Titrieren des Säuregehaltes haben wir als Indikator nicht alkalische Alizarinlösung benützt, sondern Naphtholphthalein, das sich zu jenen Wasserstoffionenkonzentrationen, welche frische Muskelextrakte besitzen, sehr gut eignet. Beim Bereiten der Extrakte haben wir die methodischen Fortschritte berücksichtigt, so haben wir mit der gesättigten Kochsalzlösung nicht bei Zimmertemperatur, sondern bei — 10° extrahiert. Wir überzeugten uns, daß gesättigte Kochsalzlösung ebenso wie Ammoniumsulfat bei Zimmertemperatur Milchsäurebildung bewirkt. Wir bemühten uns diese ernste Fehlerquelle aus Gottschlichs Versuchen zu vermeiden. Wir reizten die Muskeln mit langdauernden tetanischen Reizen durch $1^{1}/_{2}$ Stunden, zerrieben das Gewebe mit konzentrierter Kochsalzlösung, so daß das Volumen des Extraktes 10 ccm betrug, dann wurde zentrifugiert.

Aus der klaren, infolge des Glykogengehaltes nur schwach opalisieren den Flüssigkeit nahmen wir 5 ccm in die Pipette und titrierten aus einer Bangschen Bürette mit $^{n}/_{100}$-Natronlauge. Als Indikator benützten wir Naphthophthalein und titrierten bis zur hellblauen Färbung; wir überzeugten uns, daß ein Tropfen $^{n}/_{100}$-Natronlauge in gesättigter, mit Naphthophthalein versetzten Kochsalzlösung blaue Färbung hervorruft.

Tabelle V.

Versuchsnummer	Datum	Temperatur in °	Muskelgewicht in g	Dauer der Tetanisierung	Verbraucht ccm 0,01 n-NaOH		
					Gereizter Muskel	Kontrollmuskel	Differenz
14	19. VII.	18	1,19	1h 30′	2,76	2,56	0,2
15	20. VII.	18	1,13	1h 30′	1,9	1,8	0,1
16	22. VII.	18	1,15	1h 30′	2,12	2,1	0,02

IV.

Auf Grund dieser Versuche, in denen Milchsäure, sowie auch derjenigen, in welchen die allgemeine Acidität bestimmt wurde, müssen wir der Heidenhain-Gottschlichschen Lehre von der Beeinflussung chemischer Vorgänge in Muskeln durch subminimale Reize widersprechen. In Nerv-Muskelpräparaten, welche indirekt durch subminimale Einzelreize oder tetanisch gereizt wurden, zeigte sich keine chemische Veränderung. Dies Ergebnis entscheidet freilich nicht darüber, ob in Muskeln, die mit Nerven und Zentren, vielleicht auch mit sympathischen Zentren verbunden sind, nicht andere chemische Vorgänge oder in anderem Umfang stattfinden, als in isolierten Muskeln.

Literatur.

[1]) Fletcher, W. M. und F. G. Hopkins, Journ. of physiol. 35, 247. 1906. — [2]) Fletcher, W. M. Journ. of physiol. 47, 361. 1913. — [3]) Parnas, J. und R. Wagner, diese Zeitschr. 61 387. 1914. — [4]) Parnas, J., Zentralbl. f. Physiol. 30, 1. 1915. — [4a]) Danielewski, Arch. f. d. ges. Physiol. 21, 138. 1880. — [5]) v. Kries und Metzner, Arch. f. d. ges. Physiol. 1893. — [6]) Blix, Skandinav. Arch. f. Physiol. 12, 108. 1901. — [7]) Weizsaecker, Journ. of physiol. 48, 396. 1914. — [8]) Arch. f. d. ges. Physiol. 56, 355. 1894. — [9]) Keith Lucas, Journ. of physiol. 38, 113. 1909. — [10]) Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration S. 106ff. 1914. — [11]) Meyerhoff, Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 232. 1920.

Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln[1]. II[2].

Von

Jakob K. Parnas.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 30. Dezember 1920.)

Mit 2 Tafeln und 1 Abbildung im Text.

I. Methoden.

1.

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen wieder aufgenommen, welche im Jahre 1914 von Parnas und Wagner begonnen worden sind[1]). Sie beziehen sich auf den Kohlenhydrat-

[1]) Der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Warschau vorgelegt im Februar 1919.

[2]) Diese Zeitschr. 61, 387. 1914. Bemerkung zu Mitteilung I: Durch die Ergebnisse der Untersuchungen von O. Meyerhoff (Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 232, 284; 185, 11. 1920) scheint eine Reihe von Fragen, welche 1906 durch die Arbeit von Fletcher und Hopkins angebahnt worden sind, zu einem befriedigenden, widerspruchslosen, vorläufigen Abschluß gelangt zu sein. In den Arbeiten von Meyerhoff sind mehrere Ergebnisse unserer Untersuchung von 1914 korrigiert worden: so findet Meyerhoff eine Kohlenhydratdurchbildung während der Erstickung, die wir nicht finden konnten, eine Gleichzeitigkeit der Zuckerzersetzung und Milchsäurebildung im zerschnittenen Gewebe, die wir vermißten, schließlich eine Äquivalenz von Kohlenhydratschwund und Milchsäurebildung bei Ruheanoxydose. Die Ergebnisse von Meyerhoff fußen auf viel genauerer Kenntnis der Bedingungen, von welchen die Muskelvorgänge abhängen, und welche durch die späteren Arbeiten von Parnas sowie von Meyerhoff erlangt wurde; auf den methodischen Fortschritten, welche von denselben Autoren eingeführt wurden; schließlich auf einer gründlichen und umfassenderen Prüfung der in Frage kommenden Faktoren, als sie uns damals, in der ersten Arbeit dieser Art, möglich war. Dies anzuerkennen halten wir für eine gerne zu erfüllende Pflicht, auch um unnütze Diskussionen oder Unsicherheit auszuschließen. J. K. Parnas und Richard Wagner.

stoffwechsel im Muskel, der im Zusammenhang Arbeit, Ermüdung und Erholung betrachtet wird, sowie mit Zustandsänderungen des Muskelgewebes; es sollen neue Arbeitsmethoden zur Anwendung gelangen, die eine vollständigere Beherrschung der Versuchsbedingungen gestatten, als dies bisher möglich war.

Parnas und Wagner haben auf die Ursachen der unklaren Kenntnisse über den Kohlenhydratstoffwechsel der Muskeln aufmerksam gemacht, auf die Ungenauigkeiten, welche Unklarheiten und Widersprüche in so vielen trefflichen Arbeiten bedingten, die diesem Gebiete gewidmet worden sind. Der tätige oder ruhende Muskel verfügt über folgende Kohlenhydratquellen:

A. Die Kohlenhydrate, welche im Gewebe des Muskels aufgespeichert sind.

B. Die Kohlenhydrate, welche dem Gewebe mit dem Blut teils aus den Vorräten des Blutes, teils von anderen Organen (Leber und andere Muskeln) zugeführt werden.

Die Vorräte, die unter A. genannt sind, bestehen aus:

1. Glykogen, 2. höheren Polysacchariden, welche intermediäre Produkte der Glykogenhydrolyse darstellen; 3. Glucose, 4. Verbindungen der Glucose, welche durch Hydrolyse gespalten werden können.

Die unter B. genannten Kohlenhydrate können aus denselben Bestandteilen bestehen, wie die für A. aufgezählten, nur daß in den Muskelvorräten Glykogen überwiegt, in der Blutzufuhr die Glucose. In den Untersuchungen, welche sich mit dem Kohlenhydratstoffwechsel im Muskelgewebe befaßten, wurde nun immer nur ein Teil der Kohlenhydratquellen berücksichtigt. In den alten Versuchen am isolierten Muskel bestimmte man stets nur Glucose (A. 3), später nur das Glykogen. In Versuchen am im Kreislauf belassenen oder künstlich durchströmten Muskel wurden entweder nur die Glykogenvorräte oder — und dies am öftesten — nur die Blutzucker beachtet: unter diesen nur die Glucose. So wurde stets nur eine sehr unvollständige Bilanz erreicht, welche in physiologischen Versuchen die einfachsten Beziehungen nicht aufzuklären vermochten: etwa die Beziehungen zwischen Kohlenhydratabbau und Muskeltätigkeit, Milchsäurebildung, Wärmebildung. Ebenso unklare Ergebnisse ergaben sich auch in der chemischen Pathologie der Zuckerkrankheit.

Nur ausnahmsweise führten Bestimmungen der kreisenden Glucose allein zu klaren und höchst wahrscheinlich richtigen Ergebnissen: so in den Versuchen von Chauveau und Kauffmann, wo ein sehr kleiner Pferdemuskel unter physiologischen Bedingungen arbeitete, sein Betriebsmaterial aus dem großen Reservoir des kreisenden Blutes erhielt, dessen Zufluß durch die normale Innervation der Gefäße reguliert wurde. Unter diesen Umständen konnte der Muskel Kohlenhydrate verbrennen und dabei seine Vorräte auf unverändertem Niveau erhalten. Diese Versuche aber stehen einzig da.

2.

Parnas und Wagner bestimmten die Summe der Kohlenhydrate, die im Muskelgewebe enthalten waren: namentlich Glykogen, Polysaccharide, Glucose sowie die hydrolisierbaren Verbindungen der Glucose. In Versuchen an isolierten Muskeln konnten sie schon eine vollständige Bilanz des Kohlenhydratstoffwechsels aufstellen und eine Reihe von Beziehungen feststellen: so die Äquivalenz zwischen Milchsäurebildung und Kohlenhydratschwund bei Arbeit und Starre des Muskel.

Die Methode von Parnas und Wagner beruhte auf folgendem Prinzip: Aus den durch eiskalten Alkohol abgetöteten Muskeln wurde Glucose, Disaccharide, ein Teil des Glykogens und der Polysaccharide durch nacheinanderfolgende Extraktion mit Alkohol und siedend heißem Wasser ausgezogen. Der Hauptanteil des Glykogens verblieb im Gewebsrückstand und wurde darin nach Pflüger bestimmt; die ausgezogenen Kohlenhydrate wurden einer gelinden sauren Hydrolyse unterworfen, um die kolloiden Kohlenhydrate zu zerlegen. Dann wurden die stickstoffhaltigen Bestandteile des Extraktes mit Quecksilberacetat entfernt, der entquecksilberte und eingeengte Extrakt nochmals gründlich hydrolysiert, dann wurden die darin enthaltenen Kohlenhydrate nach Bertrand bestimmt. Die Summe des im Muskelrückstand enthaltenen Glykogens und der im Extrakt gefundenen Glucose ergibt — auf gleiches umgerechnet — den Gesamtkohlenhydrat des Gewebes.

Die Methode von Parnas und Wagner verlangte für eine Bestimmung erhebliche Muskelmengen: 30 bis 150 g gelangten zur Verwendung. Ihre Ausführung war sehr umständlich: die Extraktion großer Gewebsmengen, die genaue Ausfällung der Stickstoffverbindungen, Entquecksilberung, Abdampfung großer Flüssigkeitsmengen, Anreicherung der Endlösungen an Salzen, Zuckerbestimmung in zwei Portionen: alles dies sind Unbequemlichkeiten.

Im Jahre 1918 veröffentlichten Forschbach und Schäffer[1]) eine wertvolle Arbeit über den Kohlenhydratverbrauch in Muskeln normaler und pankreas-diabetischer Säugetiere. Bereits auf der Arbeit von Parnas und Wagner fußend, berücksichtigten sie die gesamten Kohlenhydrate, indem sie die Zucker bestimmten, die als Glykogen und als Glykose im Muskel enthalten sind. Sie bestimmten die Kohlenhydrate mittels einer Methode, welche sie als Modifikation der Parnas-Wagnerschen bezeichnen. m. E. mit Unrecht, denn sie ist durchaus selbständig.

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 82, 344. 1918.

Etwa 50 g Gewebe ließ man in verdünnter warmer Salzsäure quellen, zerkochte es sodann, indem gleichzeitig das Glykogen hydrolysiert wurde. Die stickstoffhaltigen Verbindungen wurden mit Quecksilberchlorid bei saurer, dann mit Quecksilberacetat bei schwach alkalischer Reaktion entfernt. Der so enteiweißte und von stickstoffhaltigen Extraktivstoffen befreite, entquecksilberte und eingedampfte Muskelauszug wurde nochmals invertiert, der darin enthaltene Traubenzucker nach Lehmann-Maquenne bestimmt.

Froschbach und Schäffer halten der Methode von Parnas und Wagner folgenden Einwand entgegen: in den Rückstand, in welchem das Glykogen bestimmt wird, konnten Dextrine enthalten sein, welche ähnlich wie das Glykogen durch Wasser schwer auszuziehen sind. Diese würden der Bestimmung im Extrakt entzogen, der alle Kohlenhydrate mit Ausnahme des Glykogens enthält. In dieser Auffassung werden Froschbach und Schäffer dadurch befestigt, daß ihnen ihre Methode etwas höhere Werte liefert als die von Parnas und Wagner.

Dieser Einwand erscheint mir nicht richtig. Die hohen Dextrine, welche so schwer diffundieren wie das Glykogen und infolgedessen im Gewebsrückstand eingeschlossen bleiben würden, müßten nach der Aufschließung des Gewebes mit Kalilauge ebenso durch Alkohol niedergeschlagen werden wie das Glykogen selber. Wenn die Forschbach-Schäffersche Methode höhere Werte für Zucker liefert als die von Parnas und Wagner, so könnte dies auch durch Abspaltung von Zucker aus komplexen Verbindungen (Nucleinsäuren, Nucleosiden usw.) infolge der sauren Hydrolyse vor der Enteiweißung erklärt werden. Auch ist zu bedenken, ob ein langdauerndes Erwärmen des Fleisches mit Säure nicht bereits diejenigen Umsetzungen beginnt, welche schließlich beim Kochen von Eiweiß in Gegenwart von Kohlenhydraten und mit starker Säure zur Bildung von Melaninen führt.

8.

Für meine Zwecke bedurfte ich einer Methode, welche es gestatten würde, die Summe der Kohlenhydrate in einzelnen Froschmuskeln zu bestimmen, also in etwa 0,5 g Gewebe. Wenn eine chemische Analyse mit einem exakten physiologischen Muskelversuch verbunden werden soll, so muß die Anforderung an die Substanzmenge möglichst eingeschränkt werden. Wollen wir etwa die Energie der Muskelspannung messen und die gleich-

zeitig verbrauchte Zuckermenge oder entbundene Milchsäuremenge bestimmen, so ist dies nur dann möglich, wenn wir diese Substanzen in einzelnen Froschmuskeln zu bestimmen verstehen: denn nur einem einzelnen isolierten Muskel können wir hinreichende Sauerstoffzufuhr bieten.

Nach verschiedenen Vorversuchen entschloß ich mich, bei dem Prinzip der Methode von Parnas und Wagner zu bleiben, aber sie noch erheblich zu vereinfachen und zu kürzen. Es kam gerade darauf an, möglichst wenig Stickstoffverbindungen in den Extrakt zu bekommen: zu diesem Behuf vermied ich es, Säure auf das Muskeleiweiß einwirken zu lassen und koagulierte das Eiweiß so bald als möglich aus. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe wurden mit Phosphorwolframsäure ausgefällt.

0,5 bis 1,5 g Muskel werden sorgfältig mit 5 ccm Alkohol zerrieben; der Auszug wird in ein Zentrifugierglas (*a*) von 12 ccm Inhalt abgegossen, der Rückstand mit einigen Quarzsandkörnern sehr fein zerrieben und in dasselbe Röhrchen (*a*) übertragen.

Nach dem Abzentrifugieren wird die Flüssigkeit in ein kleines konisches Becherglas (*b*) abgegossen. Der Rückstand im Röhrchen (*a*) aufgelockert und mit 8 ccm siedendem Wasser übergossen, zentrifugiert, die Flüssigkeit wieder zu (*b*) getan. Nun wird das geronnene Eiweiß in (*a*) eine Stunde lang mit 10 ccm Wasser im siedenden Wasserbad digeriert, der Auszug nach wiederholtem Zentrifugieren mit (*b*) vereinigt.

Der Rückstand (*a*). Das Glykogen wird nach Pflüger isoliert. Ich bediene mich dabei einer Methode, die für die Bestimmung von Glykogen in kleinen Muskelmengen in diesem Laboratorium von J. v. Przyłecki ausgearbeitet wurde. Etwa 1 g Muskel wird in einem spitzen Zentrifugierröhrchen mit 1 ccm 60proz. KOH im siedenden Wasserbad aufgelöst, mit 2 ccm Wasser verdünnt, mit 4 ccm Alkohol gefällt; die Fällung mit je 2 ccm Alkohol von 60, 80, 96%, dann mit Äther ausgewaschen, jedesmal nach dem Flüssigkeitszusatz zentrifugiert und die Flüssigkeit abgegossen. Das isolierte und mit Äther gewaschene Glykogen wird im Röhrchen belassen.

Die vereinigten Extrakte in (*b*). Man fügt 10 ccm 0,5 H_2SO_4 hinzu und hält im siedenden Wasserbad so lange, bis die Extrakte auf 10 ccm eingeengt sind. Dann versenkt man das Gläschen in das Wasserbad und hält (zugedeckt) 1 Stunde lang bei 100°. Nach Abkühlung wird langsam, Tropfen für Tropfen, 0,5 ccm einer 20proz. Phosphorwolframsäurelösung zugefügt, 2 Stunden lang in der Kälte gehalten, abfiltriert, der Niederschlag mit einer Lösung von H_2SO_4 und Phosphorwolframsäure gewaschen.

Zu dem klaren und farblosen Filtrat, das Phosphorwolframsäure im Überschuß enthalten muß, wird Methylrot als Indicator und eine 0,5 g $Ba(OH)_2$-Lösung bis zur Neutralisierung zugegeben. Wenn die Farbe der milchigen Flüssigkeit von Rosa in Blau übergeht, dann ist sowohl H_2SO_4 als

Phosphorwolframsäure niedergeschlagen. Der Niederschlag wird filtriert oder zentrifugiert, gewaschen, das Filtrat schwach mit H_2SO_4 angesäuert, ohne zu filtrieren vorsichtig auf dem Wasserbade eingeengt: dies geschieht am besten in Schälchen mit flachem Boden, die auf kleinen Wasserbadringen aufgestellt werden, es gelingt so leicht, die zuckerhaltige Lösung einzuengen, ohne daß „braune Ringe" entstehen. Wenn die Lösung auf 10 ccm eingeengt ist, dann gießen wir sie in das Röhrchen (*a*), welches das Glykogen enthält; so vereinigen wir die gesamten Kohlenhydrate des Muskelgewebes.

Zu dem Inhalt des Röhrchens (*a*) werden 0,5 ccm 36% HCl hinzugefügt und im siedenden Wasserbad 3 Stunden lang invertiert; zentrifugiert, die Flüssigkeit in einen Meßkolben von 50—100 ccm abgegossen, nachgespült, mit Soda neutralisiert, aufgefüllt. Dann wird in 10 ccm die Glucose nach Bertrand bestimmt, oder bei anderer Verdünnung nach Lehmann-Maquenne. Bei Anwendung der Methode von Bertrand erhält man reine, rotgelbe Oxydulniederschläge.

Ich kann die Schwierigkeiten nicht bestätigen, die Forschbach und Schäffer bezüglich der Fällung von Extraktivstoffen und Phosphorwolframsäure erwähnen. Wenn man langsam fällt, Überschuß an H_2SO_4 und Phosphorwolframsäure anwendet und den weniger schwer löslichen Phosphorwolframaten Zeit gibt, in der Kälte auszukrystallisieren, so sind diejenigen Substanzen abgeschieden, welche Kupferoxydul in Lösung halten; ich habe mich davon besonders überzeugt, indem ich Zuckerbestimmungen nach Reinigung mit Phosphorwolframsäure mit Bestimmungen im gleichen Material nach weiterer Reinigung mit Quecksilberacetat verglichen habe.

Es wurde in erster Linie geprüft, ob die neue Methode identische Resultate liefert, wenn sie bei symmetrischen Muskeln des gleichen Tieres angewendet wird:

24. XI. M. gastrocnemii, R. esculenta.

Gewicht des Muskels	g	1,1	1,26	0,68	0,83
Zuckergehalt im rechten Muskel	mg	12,2	15,2	8,7	9,8
	%	1,11	1,21	1,28	1,18
Zuckergehalt im linken Muskel	mg	12,3	15,1	8,8	10,0
	%	1,118	1,2	1,295	1,2

Dann wurde die Kohlenhydratmenge, bestimmt mittels der neuen Methode, verglichen mit der Glykogenmenge, die nach Pflüger bestimmt wurde:

26. XI. R. esculenta. Die rechten Muskeln wurden auf Glykogen, die linken auf Gesamtkohlenhydrat verarbeitet.

Ferner wurden die einen von symmetrischen Muskeln mit bekannten Mengen Glucose, Maltose und Glykogen versetzt und es wurde geprüft, ob die zugesetzte Menge wiederzufinden ist.

Muskel	Gewicht	Glykogengehalt		Kohlenhydratgehalt	
	g	mg	%	mg	%
M. gastrocnemii	0,985	11,9	1,21	13,58	1,38
Oberschenkel	1,13	13,4	1,185		
Adductoren	1,65			23,2	1,405
Oberschenkel	1,40	15,3	1,095		
Flexoren	1,50			20,5	1,366

28. XI. R. esculenta.

Muskel	Zugesetzte Zuckermenge	Gewicht	Zuckergehalt gefunden		Zuckergehalt berechnet	
		g	mg	%	mg	%
M. gastrocnemius	—	0,87	9,6	1,1		
" "	1 ccm 0,5% Glucose	0,87	14,5	1,665	14,6	1,68
Oberschenkel, Adductoren		1,11	12,4	1,1		
Oberschenkel, Adductoren	1 ccm 0,5% Maltose	1,545	22,1	1,43	22	1,435
Oberschenkel, Flexoren		1,095	12,7	1,16		
Oberschenkel, Flexoren	1 ccm 0,48% Glykogen	1,09	17,8	1,63	17,43	1,6

Zur Prüfung auf die Vollständigkeit der Entfernung von Stoffen, welche Abscheidung von Cu_2O hemmen, oder selbst reduzieren, wurde die Endzuckerlösung mit Quecksilberacetatlösung bei neutraler Reaktion gefällt. Der Auszug aus 1,3 g Muskel wurde auf 100 ccm verdünnt und in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde auf 100 ccm verdünnt und darin der Zuckergehalt nach Bertrand bestimmt. In der anderen wurde die Quecksilberacetatfällung vorgenommen, dann entquecksilbert, eingeengt und nach Auffüllung auf 100 ccm der Zuckergehalt nach derselben Methode bestimmt. Die Probe ohne Quecksilberacetatfällung enthält mg Zucker:

8,3 8,36 8,35

Die durch Quecksilberacetatfällung gereinigte Probe enthält mg Zucker:

8,2 8,25 8,32.

Wir sehen, daß die Reinigung der Muskelextrakte mittels Phosphorwolframsäurefällung durchaus genügt, um für die Kohlenhydratbestimmung vorzubereiten.

II. Über den mechanischen Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung im Muskel.

1.

Der mechanische Wirkungsgrad des Betriebsumsatzes im Muskel wurde des öfteren bestimmt; die Wichtigkeit der Frage

führte immer wieder zu diesen Untersuchungen. Auf zweierlei Weise versuchte man den Wirkungsgrad zu bestimmen: es wurde das Verhältnis der geleisteten Arbeit zur entwickelten Wärme am isolierten Muskel gemessen (Fick, Metzner) oder aber das Verhältnis der Arbeit, welche geleistet worden ist, zur Erhöhung des Stoffwechsels am Gesamtorganismus. Die letzteren Versuche vermögen es nicht über den Wirkungsgrad des Einzelmuskels genau Bescheid zu geben, denn man hat es hier mit sehr zusammengesetzten Maschinen zu tun, und niemals mit der Arbeit eines einzelnen Muskels.

In der vorliegenden Arbeit werde ich mich bemühen, das Verhältnis der maximalen Arbeit, die eine Muskelzuckung zu leisten vermag, zu derjenigen Energiemenge zu bestimmen, welche dem gleichzeitig festgestellten Stoffwechsel des Muskels entspricht. Wir fassen den Kohlenhydratumsatz ins Auge und betrachten ihn vorderhand — auf Grund vorhergegangener Untersuchungen[1]) — als den Hauptbetriebsstoffwechsel des arbeitenden Muskels, sofern längere Arbeitsperioden in Betracht kommen. Diese Auffassung wird durch die hier mitzuteilenden Versuche zu stützen oder zu stürzen sein: Wir werden uns zu überzeugen haben, ob der Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung mit den Bestimmungen des Wirkungsgrades des Energieumsatzes $\left(\frac{\text{Arbeit}}{\text{Wärme}}\right)$ oder der Verbrennungen überhaupt übereinstimmt; ob demnach die Annahme eines anderen energieliefernden Prozesses im Muskel notwendig ist oder nicht.

Die Untersuchungen von A. Fick und die späteren von A. Metzner haben heute, soweit sie sich auf den mechanischen Wirkungsgrad des Energieumsatzes einer Muskelzuckung beziehen, nur mehr historische Bedeutung. Diese Forscher kannten die Erholungswärme der Muskelzuckung nicht und konnten diese Wärmemenge, die etwa die Hälfte des gesamten Umsatzes eines Muskelzyklus ausmacht, weder berücksichtigen noch ausschließen. Die neue Grundlage unserer Kenntnisse von den thermischen Erscheinungen der Muskelzuckung bilden die Untersuchungen von A. V. Hill[2]). Hill bestimmte den Wirkungsgrad der Muskelmaschine, indem er in der Bestimmung der geleisteten

[1]) Zentralbl. f. Physiol. 30, 1. 1915. Diese Zeitschr. 61, 382. 1914.
[2]) Ergebnisse der Physiologie 15, 341. 1916.

Arbeit näher als Vorgänger an die maximale Arbeit der Muskelzuckung heranrückte und in der Bestimmung der entwickelten Wärme, die in seiner Anordnung — isometrische Zuckungen — den gesamten Energieumsatz darstellt, die Erholungswärme nahezu ausschloß. Hill fand in Sartorien bis 90% der Zuckungsenergie als Arbeit, was bei der Annahme, daß die Erholungswärme der Zuckungswärme gleich ist, einem mechanischen Wirkungsgrad von 45% entspricht

In meinen Versuchen führten die Muskeln Tausende von Zuckungen und Erholungen aus, deren maximale Arbeit gemessen wurde; der Versuch wird so geleitet, daß keine Ermüdung erfolgt, daß jede Ermüdung durch die nachfolgende Erholungsperiode beseitigt wird. Die einzige Veränderung infolge der Arbeitsleistung ist die Abnahme des Kohlenhydratgehaltes im Muskel. Die Beherrschung der Versuchsbedingungen, wie sie in den vorhergehenden Veröffentlichungen beschrieben worden ist, machte solche Versuche möglich.

So wird das Verhältnis der geleisteten maximalen Arbeit zu der aus dem Kohlenhydratumsatz berechneten Energieproduktion bestimmt werden.

2.

Die isolierten Froschmuskeln zuckten isometrisch; bei dieser Art der Muskelzuckung können wir die maximale Arbeit schätzen, welche der Muskel bei reversibler Zusammenziehung leisten könnte. Hill[1]) lehrte die Undeutlichkeit der Bedingungen einer isotonischen Zuckung kennen: bei großer Belastung ist die isotonische Arbeitsleistung zum großen Teil als Arbeit der elastischen Kräfte des untätig durch Belastung gespannten Muskels anzusehen und entspricht der potentiellen Energie des untätigen Muskels. Bei geringer Belastung stellt die geleistete Arbeit nur einen geringen Teil der maximalen Arbeit dar: denn zu Beginn der Zuckung ist die Belastung zu gering, der Muskel könnte eine größere heben; zu Ende der Zuckung ist sie zu hoch, denn bei einer geringeren Belastung könnte der Muskel höher zucken. Da es unmöglich ist, einen Versuch so zu leiten, daß die Belastung auf jeder Zuckungsstufe gerade so groß wäre, als der Muskel sie um eine sehr kleine Strecke heben könnte, — also daß die Zuckung reversibel verliefe — so müssen wir die isotonischen Muskelzuckungen bei Messungen der maximalen Arbeit verwerfen.

Wir verwenden also isometrische Zuckungen und verzeichnen die erreichten Maximalspannungen mittels eines Bürkerschen Federmiographen auf einen langsam laufenden berußten Fühnerschen Kymographen. In jedem Versuch wird der Spannungsmesser einmal oder mehrmals geeicht.

[1]) Journ. of physiol. 46, 435. 1913.

Jeder Strich im Diagramm stellt die größte Spannung einer Muskelzuckung dar, und aus dieser Spannung und der Länge des Muskels können wir die Arbeit berechnen, welche der Muskel leisten würde, wenn er sich im Augenblick der maximalen Spannung reversibel zusammenziehen würde. Er ist dann ein elastischer gespannter Körper, in welchem eine weitere Umwandlung der chemischen Energie in mechanische und thermische nicht mehr stattfindet; die Energie der mechanischen Spannung wandelt sich, wenn nicht sofort in mechanische Arbeit, in Wärme um.

Hill berechnet die maximale Arbeit der isometrischen Muskelspannung auf Grund folgender Überlegung: ein elastischer Stab hat unter der Spannung T die Länge x, unter der Spannung O die Länge hx, wo h ein echter Bruch ist; er besitzt dann die Spannungsenergie

$$\frac{T \cdot (x - hx)}{2} = \frac{Tx(1-h)}{2}.$$

Den Bruch $\frac{1-h}{2} = \mu$ können wir bestimmen, wenn wir den Verlauf der Abhängigkeit der Spannung von der Länge zwischen den Längen x und hx und den Spannungen T und O kennen. Dies ist aus dem Diagramm ersichtlich:

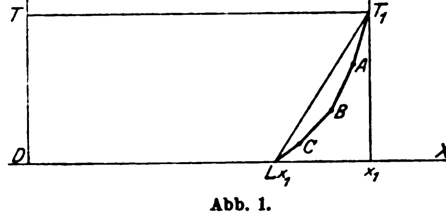


Abb. 1.

Ox stellt die Länge des gespannten gereizten Muskels dar, $x_1 T_1$ seine Spannung. Wenn er sich bis zur Länge Ohx so zusammenziehen würde, daß die Spannung längs der Geraden $T_1 \cdot hx_1$ abfiele, so würde die maximale Arbeit

$$\frac{[(Ox_1) - (O[hx_1])]\,T}{2}$$

betragen; fiele sie aber längs der Linie T_1, A, B, C, hx_1 ab, so wird die maximale Arbeit durch die Fläche x_1, T_1, A, B, C, hx_1 dargestellt und bildet einen anderen Bruch μ der Fläche $(Ox_1)T_1$.

Diesen Bruch bestimmen wir, indem wir den Muskel eine Reihe von Zuckungen ausführen lassen und bei jeder Zuckung ihm gestatten, sich um 1 mm mehr zusammenzuziehen: wir messen bei jeder Zuckung die Spannung, welche der Muskel bei der Länge $(x-1)$, $(x-2)$, $(x-3)\ldots$ $(x-n)$ nun zu entwickeln vermag, wobei $(x-n) = hx$ entspricht, wo die Spannung schon gleich O wird. So erfahren wir den Verlauf der Linie $TABC(hx_1)$.

Indem wir die Werte für Spannung und Länge im Sinne des obigen Diagramms aufzeichnen und der Größe der Oberfläche $T_1(hx_1)x_1$ bestimmen — etwa durch Wägen der ausgeschnittenen, auf gutem Millimeterpapier aufgezeichneten Fläche — erfahren wir, welchen Bruch der Fläche $OT_1 \cdot Ox_1$ die Fläche $T_1(hx_1)x_1$ bildet. So können wir hier für den gegebenen Muskel erfahren, welcher Bruchteil des Produktes Spannung $\times$ Länge die maximale Arbeit darstellt, welche dieser Muskel bei dieser Spannung und Länge reversibel leisten könnte.

Hill[1]) und N. K. Adam für 11 verschiedene Muskeln (sartorii, graciles, semimembranosi) Werte für $\frac{1}{\mu}$ die zwischen 5,3 und 9,7 lagen: der Durchschnitt lag bei 6,9. Hill reduziert diesen Wert auf 6, indem er in Betracht zieht, daß während der Zuckungen, die zur Aufnahme des Spannungs-Länge-Diagramms dienen, die Muskeln weniger Spannungsenergie entwickeln, als wenn sie die ganze Zeit lang bei der Länge x_1 gehalten würden: denn die Zuckung erfolgt schon zum Teil bei geringerer Länge, der Zuckungsumsatz aber ist von der Länge der Muskelfaser abhängig (Blix, Hill). Hill berechnet die maximale Arbeit immer aus der Formel $\frac{1}{6}\,T \cdot l$; ich bediente mich gleichfalls dieser Formel für Sartorien und Gastrocnemien, gelangte aber zu paradoxen Ergebnissen und mußte die Bestimmungen von μ wiederholen. Später bestimmte ich das Spannungs-Länge-Diagramm in jedem Versuch (für jeden Muskel) einmal oder zweimal.

Die maximale Arbeit der Spannung, die in einem Versuch entwickelt worden ist, wird also in folgender Weise bestimmt: die Streifen, welche von den Einzelstrichen der Muskelzuckungen gebildet werden, teilt man in Abschnitte, welche annähernd gleiche Spannungen enthalten, oder gleichmäßige Zunahmen oder Abnahmen zeigen. Man berechnet nun die Zahl der Zuckungen und mißt die durchschnittlichen Spannungen eines jeden Abschnittes in Grammen aus; so berechnet man die Summe der entwickelten Spannung. Die Muskellänge wird im Versuch mittels des Kathetometers bestimmt. Wenn z. B. ein Muskel bei der Länge von 40 mm 10 000 Zuckungen mit der Spannung von 40 g ausführte, μ in diesem Versuch zu $^1/_{10}$ bestimmt wurde, so ist die maximale Arbeit in Grammcalorien

$$A = \frac{10{,}000 \cdot 40 \cdot 4 \cdot 10^{-4}}{10 \cdot 4{,}26} = 3{,}76 \text{ cal.}$$

3. Die Bestimmung des Kohlenhydratschwundes.

Es wurde ein symmetrisches Paar von Nerv-Muskelpräparaten angefertigt; der eine Muskel diente als Kontrolle und wurde zu Beginn des Versuches durch Alkohol abgetötet. Der andere Muskel machte den Versuch durch und wurde dann abgetötet und analysiert. Die invertierte Lösung, welche die Kohlenhydrate aus 1 g Muskelgewebe enthielt, wurde zu 200 ccm verdünnt und in 10 ccm die Traubenzuckerbestimmung ausgeführt; aus einem Sartorius wurde nur zu 25 ccm verdünnt und in 10 ccm analysiert.

4. Das Muskelmaterial.

Es wurden M. Gastrocnemii mit dem Nerven und Rückenmarkstückchen, nach Ewald[2]) präpariert verwendet; ferner auch M. Sartorii, sowie ein Präparat, welches den M. semimembranosus samt dem N. ischiaticus r. profundus sowie den Hauptstamm und Rückenmarkstück enthielt.

Der Sartoriusmuskel eignet sich auch hier am besten, wenn er tadellos ohne die geringste Beschädigung präpariert worden ist. Die flache Form

[1]) Journ. of physiol. 46, 435. 1913.

[2]) Das Straßburger physiologische Practicum. Leipzig 1912.

ermöglicht eine so ausgiebige Sauerstoffzufuhr, daß man bei Zuckungen viel häufiger, als bei anderen Muskeln, ohne Ermüdung setzen kann. Ich konnte zur Zeit dieser Versuche noch keine Sartorius-Nervpräparate anfertigen, die ich an anderer Stelle beschreiben werde. Da man das gewöhnliche Sartoriuspräparat durch den Muskel hindurch in den Nervstumpf reizen muß, so verdirbt das Präparat relativ schnell, die Erregbarkeit sinkt, wenn auch die Kontraktilität bei maximalen Reizen während langer Zuckungsreihen (etwa 8000 Zuckungen) unverändert bleibt.

Das Gastrocnemiuspräparat ist bei langsamer Zuckungsfolge (alle 12—20″) beinahe unermüdbar, wenn durch den Nerv gereizt wird. Die Ausschläge im Kohlenhydratgehalt sind hier undeutlicher als bei Sartorien, denn man kann in der gleichen Versuchszeit aus einem Sartorius dreimal mehr Arbeit und Umsatz herausholen, als aus einem Gastrocnemius.

Es wurden nur solche Präparate verwendet, welche aus gesunden, kräftigen, blutreichen Fröschen stammten und ohne Verletzung oder Zuckung (von der obligaten Sartoriuszuckung bei Nervdurchschneidung abgesehen) präpariert worden sind.

5. Versuchsanordnung.

Die Muskeln arbeiten in einer Kammer, wie sie in einer vorhergehenden Arbeit beschrieben worden ist. Der Muskel hängt an Platinhaken und Lamettafaden am Hebel; der Faden ist durch zähe Vaseline hindurchgeführt, welche die Kammer abschließt. Ein zweites Lamettaband, das am unteren Ende des Muskels hängt, geht in Vaseline durch den Boden der Kammer hindurch; an ihm wird ein Gewicht angehängt, welches die Grundspannung des Muskels während des Versuches bildet (20 g), und die Abszissenachse auf die Trommel aufzeichnet; dann wird noch die Eichung des Spannungsmessers für etwa 20, 30, 40, 50, 70 g Spannung aufgezeichnet. Das Gewicht wird noch durch den Haken der Schraube *S* ersetzt, die einen Schritt von 1 mm hat, und mittels dieser Schraube wird der Muskel so weit gespannt, daß die Hebelspitze wieder die Spannung von 20 g anzeigt. Die Schraube dient dazu, um die Spannung leicht korrigieren zu können, sowie zur Aufnahme des Spannungs-Länge-Diagramms.

Es wurde mit Öffnungsströmen eines großen Induktoriums gereizt, die Ströme der Primärspule wurden durch eine Bowditchsche Uhr unterbrochen. Wenn der N. ischiadicus gereizt wurde, so genügte ein Rollenabstand von 40—50 cm (1 Akkumulator) um maximale Zuckungen zu erreichen.

Es war nicht nötig, während eines Versuches den Rollenabstand zu verändern. Die Reize waren stets gerade übermaximal gehalten.

Der isometrische Muskelhebel nach Bürker verzeichnet die Zuckungen auf einem Fühnerschen Kymographion, dessen Umlauf auf etwa 10 Stunden gestellt ist; es ist in den meisten Kurven möglich, auch ohne Lupe die einzelnen Zuckungen zu unterscheiden; jedenfalls ist das Ausbleiben einer Zuckung zu bemerken.

Die Kammer wird langsam mit feuchtem Sauerstoff durchlüftet.

6. Der Verlauf der Versuche.

Das Bild der Muskelzuckungen sieht anders aus als das bekannte Bild der zur Ermüdung führenden Muskelzuckungen. In den Versuchen fällt die große Energiemenge auf, die durch die Muskelzuckungen entwickelt wird und das Fehlen der Ermüdung — sowohl der Muskelermüdung als auch der Endplattenermüdung. Während nach Ed. Weber[1]) 1 g isolierten Muskels etwa 63 300 mg, also 0,149 Cal. zu leisten vermag, wenn er bis zur Ermüdung gereizt wird, und nach Radwanska[2]) ein Froschgastrocnemius, der also etwa 0,5 g wiegt, etwa 50 000 mg, d. i. 0,1 Cal. zu entwickeln vermag, leistet in unseren Versuchen ein Froschsartorius von 0,149 g 2,3 Cal. ohne die geringste Ermüdung. In einem Versuche von Hill[3]), dessen Zahlen angegeben werden, leistet ein Sartorius von 0,29 g schon 0,65 Cal., wenn er bis zur Erschöpfung arbeitet.

In den überlebenden Gastrocnemius-Präparaten ist die Ermüdung nicht ganz ausgeschlossen. In jedem Versuch sehen wir zu Beginn die Erscheinung der Treppe; dann folgt eine kurze Periode des Absinkens der Zuckungsstärke. Innerhalb einiger Stunden vom Beginn des Versuches gerechnet, bildet sich ein konstantes Niveau der Muskelzuckungen aus, welche dann während Tausender von Zuckungen unverändert bleibt. Die Höhe dieser Zuckungen hängt von der Frequenz der Zuckungen ab, sie ist kleiner bei öfteren Zuckungen: sie hängt offenbar von dem Grade der Ermüdung ab, der konstant bleibt und wahrscheinlich mit einem konstanten Spiegel der Ermüdungsprodukte zusammenhängt, welcher wiederum durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Milchsäurebildung und Milchsäureverbrennung bedingt wird: dieses hängt wiederum von Zuckungsfrequenz und Sauerstoffzufluß ab. Wenn eine Pause eintritt, mag sie nur wenige Minuten dauern, so folgt wiederum eine Treppe, die zu höheren Zuckungen führt; dann ein Rückgang auf das ursprüngliche konstante Niveau. Es fand also eine Erholung statt; die Zuckungen nach der Erholung ragen um so höher über das konstante Niveau hinaus, je länger (innerhalb gewisser Zeitgrenzen, die zur vollständigen Erholung führen) die Erholung währte und je tiefer das konstante Zuckungsniveau lag.

[1]) Wagners Handwörterbuch der Physiologie.
[2]) Bull. de l'acad. des science de Cracovie 1910, S. 728.
[3]) Journ. of physiol. 48, XII. 1914.

In 15–20 Stunden nach Beginn der Zuckungen tritt eine neue Erscheinung auf; bei gleicher maximaler Reizstärke werden die Zuckungen kräftiger, der Streifen, welcher die erzeugte Spannung darstellt, wird breiter als tags zuvor. Diese Erscheinung ist durchaus regelmäßig: sie ist in einem jeden Versuchsdiagramm zu beobachten. Ich weiß nicht, durch welche Faktoren diese Erscheinung bedingt wird: sollte hier eine Erscheinung der „scheinbaren Erregbarkeitssteigerung" vorliegen oder tatsächlich eine erhöhte Leistung, etwa infolge schnellerer Zuckermobilisierung im Gewebe?

Der Versuch wurde stets beendet, wenn der Muskel noch volle Erregbarkeit und Contractilität zeigte: es wurde niemals zur Ermüdung oder Erschöpfung gebracht. Nur unter diesen Bedingungen kann die geleistete Arbeit zu den chemischen Vorgängen in Beziehung gebracht werden, welche gleichzeitig stattgefunden haben; dann kann man annehmen, daß im Muskel aufgespeicherte Energie nicht entladen worden ist. Um in die Berechnung des Wirkungsgrades keinen Fehler durch Einberechnung der Arbeit einzuführen, die auf Kosten vorhergehender Erhitzungsprozesse geleistet worden ist, wurde der Spannungsüberschuß der ersten Hunderte von Zuckungen über das später erreichte konstante Niveau nicht mitgerechnet.

Der Versuch, das konstante Plateau der Zuckungsspannungen durch den zugehörigen Milchsäuregehalt zu charakterisieren, schlug fehl, denn der Milchsäuregehalt war an sich so gering, daß Unterschiede, die verschieden hohen Plateaus entsprächen, nicht mehr sicher festzustellen waren.

Der Bruch μ, welcher das Verhältnis der maximalen Arbeit zum Produkt Länge × Spannung des Muskels darstellt, wurde für den im Gastrocnemius in sechs Versuchen bestimmt[1]). Ich fand $\mu = \frac{1}{10}, \frac{1}{11,5}, \frac{1}{12}, \frac{1}{11,2}, \frac{1}{10,7}, \frac{1}{9,9}$, durchschnittlich $\frac{1}{10,9}$; mit der von Hill angewandten Korrektur von — 15% $\frac{1}{9,3}$. Für Sartorien wurde gefunden: $\mu = \frac{1}{7,6}, \frac{1}{7,6}, \frac{1}{6,9}, \frac{1}{8}$, durchschnittlich $\frac{1}{3,7}$, korrigiert $\frac{1}{6,2}$, also nahezu soviel, wie die Hillsche Zahl $\frac{1}{6}$.

[1]) Andere Werte bei Meyerhoff, Arch. f. d. ges. Physiol. 182, 275. 1920.

Es war noch die Kenntnis des Kohlenhydratschwundes unter denjenigen Bedingungen der Temperatur und Atmosphäre notwendig, in welcher sich der arbeitende Muskel befand. Parnas und Wagner fanden bei einem Aufenthalt von 20 Stunden in Stickstoff bei 12° keine deutliche Abnahme des Kohlenhydratgehalts; es wurden aber in jenen Versuchen keine Bestimmungen an symmetrischen Beinen, sondern an ganzen Hinterteilen ausgeführt; um den Einfluß individueller Schwankungen im Kohlenhydratgehalt auf das Ergebnis auszuschalten, wurden sehr viele Beinpaare gleichzeitig verarbeitet. Vielleicht ist diese Versuchsanordnung, die von Parnas und Wagner später auch verlassen worden ist, für die Auffindung kleiner Differenzen nicht empfindlich genug[1]).

Ich habe den Kohlenhydratschwund in Gastrocnemien (mit Nerv und Mark) bestimmt, welche in Sauerstoff und denjenigen Temperaturgrenzen gehalten wurden, in welchen sich der Muskel im eigentlichen Versuch befand: die Temperatur schwankte während des Tages zwischen 10 und 18°, und wurde in jedem Versuch durch ein Registrierthermometer verzeichnet. Es war leider nicht möglich, in den Hauptversuchen konstante Temperatur zu sichern.

Ich fand in vier Versuchen einen Kohlenhydratschwund von 0,05, 0,07, 0,05, 0,045% des Muskelgewichtes für 30 Stunden, durchschnittlich 0,054% in 30 Stunden. Es wird zu überlegen sein, ob der Wert für den Ruheverbrauch von dem Wert für den Arbeitsverbrauch bei Berechnung des Wirkungsgrades abzuziehen ist oder nicht.

7. Ergebnisse.

Die Tabelle I enthält die Ergebnisse.

In den Kolonnen 17 und 18 sind zwei Reihen von Berechnungen des Wirkungsgrades verzeichnet. Die erste (Kolonne 17) ist unter der Voraussetzung berechnet, daß im arbeitenden Muskel der minimale Ruheumsatz nicht anders stattfindet, als im ruhenden Muskel, daß der Gesamtumsatz des arbeitenden Muskels die Summe des Ruheumsatzes und des Arbeitsumsatzes darstellt. Die andere Berechnung (Kolonne 18) beruht auf der Voraussetzung, daß der Gesamtumsatz des arbeitenden Muskels der

[1]) Dies wurde auch von Meyerhoff festgestellt. Arch. f. d. ges. Physiol. **185**, 41. 1920.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Versuchsnummer	Datum	Muskeln	Dauer des Versuches	Muskelgewicht	Muskellänge	Reizfrequenz	Gehalt an Kohlenhydraten vor dem Versuch	Gehalt an Kohlenhydraten nach dem Versuch	Differenz zwischen Kol. 8 u. 9	Wert aus Kol. 10 vermindert um Ascheumsatz	Verbrennungswärme des Zuckers nach Kol. 10	Verbrennungswärme des Zuckers nach Kol. 11	Zahl der Zuckungen	Erzeugte Spannung 9 · 10⁴	Maximale Arbeit in cal.	Wirkungsgrad nach Kol. 12 und 16 %	Wirkungsgrad nach Kol. 13 und 16 %
6	16. XII.	Gastrocnemien	40h 30′	1,3	3,8	6″	19,8	15,5	4,3	3,4	16,3	13	15610	3,38	3,48	21,6	27
21	13. I.	Gastrocnemien	44h 5′	1,3	3,6	12″	18,65	16,5	2,15	1,1	8,2	4,18	8442	3,049	2,28	32,2	54,3
22	15. I.	Gastrocnemien	28h 50′	1,24	3,7	20″	19,8	17,7	2,1	1,43	8	5,43	4155	2,26	2	25	36,6
23	17. I.	Gastrocnemien	31h 50′	1,42	3,61	20″	28	25,5	2,5	1,5	9,5	5,7	4633	2,75	2,33	24,5	40,5
28	20. I.	Gastrocnemien	31h 5′	1,03	3,2	20″	21,65	19,75	1,9	1,4	7,2	5,32	4516	2,48	1,865	26	35
29	22. I.	Gastrocnemien	31h 5′	1,06	3,35	20″	18,2	15,6	2,6	2,0	9,9	7,6	5665	2,48	1,95	20	25,7
30	4. II.	Sartor.	28h	0,149	4,15	12″	3,17	1,80	1,31	1,235	5	4,7	7340	1,8	2,3	46	49
31	6. II.	Sartor.	28h	0,212	4,3	12″	4,2	2,75	1,45	1,34	5,5	5,1	6820	1,74	2,4	43,6	47

Arbeit dienen kann. Im ersten Fall ist der Wirkungsgrad der Gastrocnemien sehr hoch, er erreicht durchschnittlich 34% und in einem Fall (Vers. 20) den unwahrscheinlichen Wert von 54%. In den Sartorienversuchen finden wir den Wirkungsgrad 50%, dessen Berechnung von den Annahmen über den Ruheverbrauch in höherem Grade unabhängig ist: da der Sartorius für sein Gewicht viel mehr Arbeit in der Zeiteinheit leisten kann als der Gastrocnemius, so fällt daneben der Ruheumsatz weniger ins Gewicht.

Wenn wir den Einfluß der Arbeit auf den Stoffumsatz bei ganzen Organismen betrachten, dann unterscheiden wir den minimalen Ruhestoffwechsel, der in den besten Versuchen der vollständigen vorsätzlichen Muskelruhe entspricht und den Umsatz darstellt, der dem geringsten Betrieb des Herzens, der Drüsen, der Atmungsarbeit, der Arbeit der unwillkürlichen

Muskeln, dem Ruheumsatz aller Gewebe, der inneren Erhaltungs- und Regenerationsarbeit der Zellen usw. entspricht. Daß im Falle von Muskelarbeit der Arbeitsumsatz sich auf dem Plateau des Ruheumsatzes aufbaut, ist selbstverständlich. Im isolierten Muskel können die Dinge anders liegen. Der Ruhestoffwechsel kann als Folge der Labilität gewisser Bestandteile des Muskelgewebes aufgefaßt werden, etwa des Glykogens, des Traubenzuckers, der Milchsäurevorstufe, als der Umsatz derjenigen inneren Arbeit der Zelle, welche der Labilität dieser Stoffe im Gewebe entgegenwirkt. Diese Labilität kommt z. B. in der anäroben Milchsäureproduktion des isolierten Muskels und der gleichzeitigen Abnahme seiner Arbeitsfähigkeit zum Ausdruck, die innere Arbeit darin, daß der Muskel in Sauerstoff seinen ursprüngichen Zustand und Arbeitsfähigkeit unter fortwährenden Verbrennungen bewahrt. Müssen wir annehmen, daß diese innere Arbeit auch dann geleistet werden muß, wenn der Muskel in kurzen Zeitabständen entladen (ermüdet) und wieder geladen (erholt) wird? Dies ist nicht selbstverständlich. Stellen wir uns einen Wasserbehälter vor, aus dem zufolge der Undichtigkeit der Ventile Wasser durch die Turbine dauernd entweicht, ohne die Turbine zu bewegen; der Verlust an Wasser und aufgespeicherter Energie kann erhebliche Werte annehmen. Wenn wir aber die Ventile öffnen und den vollen zum Betrieb der Turbine nötigen Strom ausfließen lassen, dann läuft die Turbine und der Ruheverlust kommt für den Wirkungsgrad der Maschine nicht in Frage.

Ich glaube aber, daß die Arbeitsperioden in den hier beschriebenen Versuchen nicht oft und nicht lang genug sind, um den obigen Vergleich anwenden zu können. In den Erholungsperioden, die lang dauern, muß sich die Labilität der Betriebsstoffe geltend machen, wie sich die Undichtigkeit der Ventile während des Vollpumpens des Behälters geltend machen muß.

Aus diesem Grunde halte ich die Zahlen der Kolonne 18 für die besser begründeten. Auf Grund dieser Zahlen wäre der mechanische Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung in Gastrocnemien gleich 0,35, in Sartorien 0,5.

Hill fand für Sartorien, wenn nur die Zuckungswärme, nicht die Erholungswärme in Betracht gezogen wurde, das Verhältnis $\frac{T \cdot l}{6 \times \text{Wärme}}$ gleich 1,01, 0,55, 0,9, 0,87; in dem Versuch, den er

als den bestgelungenen bezeichnet, 0,87. Für Semimembranosi fand Hill das genannte Verhåltnis gleich höchstens 0,57. Bei Berücksichtigung der Erholungswärme ergibt sich dann für Sartorien ein Wirkungsgrad der chemischen Umsetzungen gleich etwa 0,5, für Semimembranosi 0,25.

Die Werte, die hier gefunden worden sind, sind hoch; vergleichen wir sie aber mit dem Wirkungsgrad der Stoffwechselerhöhung am Gesamtorganismus, der etwa 25% beträgt, so kann unser Wert nicht als zu hoch betrachtet werden. In den Versuchen am Gesamtorganismus haben wir es nicht mit der Maximalarbeit zu tun, ja, nicht einmal mit Einzelzuckungen, sondern mit kurzen Tetanie; die geleistete Arbeit bleibt dann hinter dem theoretischen Maximum dessen, was die maximal gespannten Muskeln bei reversibler Zusammenziehung leisten könnten, noch weit zurück. Ferner fällt ein erheblicher Teil der Erhöhung des Energieumsatzes des Organismus auf die Arbeit der Antagonisten, des Herzens. der Atmungsmuskeln usw.

Die Übereinstimmung des Wirkungsgrades der Kohlenhydratverbrennung mit dem von Hill ermittelten Wirkungsgrad des Energieumsatzes scheint mir eine gewichtige Stütze der Auffassung zu sein, daß im isolierten Muskel der Kohlenhydratumsatz der Betriebsumsatz ist. Wir werden diese Auffassung noch prüfen, indem wir den Wirkungsgrad des Sauerstoffverbrauches mit dem Wirkungsgrad des Kohlenhydratschwundes vergleichen werden.

Über den Kohlenhydratstoffwechsel der isolierten Amphibienmuskeln. III.

Der Umsatz in Muskeln pankreasdiabetischer Tiere[1]).

Von

Jakob K. Parnas.

[Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Warschau[2]).]

(Eingegangen am 30. Dezember 1920.)

Die Grundlagen, welche in vorhergehenden Arbeiten dargelegt worden sind, ermöglichen es, die wichtige Frage der Kohlenhydratverbrennung im Diabetes neu aufzunehmen[3]). Ist die Kohlenhydratverbrennung in denjenigen Zuständen des Organismus herabgesetzt, welche wir als Diabetes bezeichnen, in welchen Zucker durch Glucosurie bei bestehender Hyperglykämie und normal funktionierender Niere dem Organismus verlorengeht[4])?

Wir werden diese Frage an Hand von Versuchen über experimentellen Diabetes erörtern, welcher durch Pankreasexstirpation hervorgerufen wird: denn dieser Diabetes bietet die meisten Analogien mit dem Diabetes mellitus des Menschen.

Die Hyperglykämie kann bei dieser Diabetesform durch zwei Faktoren bedingt sein:

1. Durch Herabsetzung der Fähigkeit, Glykogen zu bilden, oder durch Begünstigung der Glykogenhydrolyse: jedenfalls durch

---

[1]) 1. Mitteilung: Parnas und Wagner, diese Zeitschr. **61**, 387. 1914. 2. Mitteilung. Diese Zeitschr. **116**, 71. 1921.

[2]) Der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Warschau vorgelegt Februar 1919.

[3]) Nachdem mir die Literatur durch längere Zeit unzugänglich war, kann ich die Arbeit von Ernst J. Lesser (diese Zeitschr. **103**, 1. 1920), die sich mit denselben Fragen beschäftigt und zu ähnlichen Ergebnissen gelangt, nur in dieser Form erwähnen.

[4]) Siehe z. B. Noorden, Die Zuckerkrankheit 1918, Gigon, Neuere Diabetesforschung. Erg. d. inn. Med. **9**. 1920; Lichtwitz, Klinische Chemie 1918, S. 131.

Herabsetzung der Glykogenbeständigkeit in der Leber und demzufolge Störung des wichtigsten unter den Faktoren, welche den Zuckerspiegel im Blut regulieren.

2. Durch Herabsetzung der Fähigkeit, Zucker in den Verbrauchsorganen, also im Herzen, den Muskeln, in der Leber und den Drüsen zu verbrennen, oder allgemeiner, zu zersetzen.

Seit der Entdeckung des experimentellen Pankreasdiabetes wurde über die Frage experimentiert und nachgedacht, ob eine Herabsetzung des Zuckerverbrauches in Frage kommt oder nicht.

Diejenigen Autoren, welche in den letzten Jahren über diese Frage gearbeitet oder zusammenfassend geschrieben haben, gelangten zu verschiedenen Entschlüssen und vielfach zur Bekenntnis, daß die Frage, ob die Traubenzuckerverbrennung im Diabetes herabgesetzt ist, als unentschieden zu betrachten sei.

Wir beschränken uns darauf, diejenigen Versuche kurz zu besprechen, welche sich auf die Zuckerverbrennung durch Muskeln beziehen.

In den letzten Jahren haben M. Landsberg[1]) sowie J. Forschbach und Schaeffer[2]) darüber gearbeitet. Landsberg bestimmte den Zuckerverbrauch aus dem Blut, welches durch arbeitende Hinterextremitäten von normalen und pankreaslosen Hunden floß; er fand keinen Unterschied zwischen dem Verbrauch normaler und pathologischer Muskeln. Landsberg berücksichtigte die Kohlenhydratvorräte der Muskeln nicht; er stellte aber eine sehr wichtige Tatsache fest, nämlich daß der Zuckergehalt im Blut auf den Zuckerverlust aus dem Blut ohne Einfluß ist.

Forschbach und Schaeffer bestimmten den Kohlenhydratverlust in den hinteren Extremitäten normaler und pankreasloser Hunde; die physiologische Zirkulation des Blutes war erhalten. Der Gesamtgehalt des Muskels an Kohlenhydraten wurde bestimmt, jedoch der im Blut kreisende Zucker vernachlässigt. So arbeitete — worauf Forschbach und Schaeffer nicht achteten — der normale Muskel bei geringem Zuckergehalt des Blutes und großen Vorräten im Gewebe, dagegen der diabetische Muskel bei minimalen Vorräten und hohem Spiegel der Glucose im kreisenden Blut.

Forschbach und Schaeffer gelangen zum Schluß, daß im Diabetes die Zuckerverbrennung gehemmt ist. Die Unterschiede zwischen den Bedingungen im normalen und pathologischen Versuch sowie die Nichtberücksichtigung des kreisenden Zuckers lassen diesen Schluß bedenklich erscheinen. Über Verbrauch oder Nichtverbrauch von Zucker im Gewebe können nur solche Versuche Aufschluß geben, in welchen alle Kohlenhydrate berücksichtigt werden, welche mit dem arbeitenden Muskel in Berührung

---

[1]) Dtsch. Arch. f. klin. Med. **115**, 465. 1914.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **82**, 334. 1918.

kommen. Sonst besteht eine Lücke, welche den ganzen Versuch undeutlich macht und die Schlüsse zweifelhaft erscheinen läßt, die auf ihn gestützt werden.

Die Versuche, über welche hier berichtet wird, wurden an isolierten Muskeln pankreasloser, diabetischer Winterfrösche ausgeführt. Die Fragestellung setzt sich aus folgenden Teilfragen zusammen:

1. Werden Kohlenhydrate während der Ruhe sowie der Arbeit bei pankreaslosen Tieren im Muskel verbraucht?

2. Werden sie dabei, wie in normalen Muskeln, über Milchsäure abgebaut?

3. Wird Milchsäure in den Muskeln pankreasloser Frösche verbrannt?

4. Welchen mechanischen Wirkungsgrad hat die Kohlenhydratverbrennung in Muskeln diabetischer Frösche?

Das Material und die Vorbereitung der Versuche.

Die Versuche wurden an großen Wasserfröschen ausgeführt, welche in den Gegenden von Warschau eingefangen worden sind. Da für solche Versuche der allgemeine Zustand der Tiere von Bedeutung ist, so will ich bemerken, daß die Frösche in einem ungeheizten Zimmer in einem Bassin gehalten wurden, der mit feuchtem Moos gefüllt war. Diese Art der Aufbewahrung erwies sich als die beste, jedenfalls war sie besser als die Aufbewahrung der Frösche in fließendem Wasser bei Zimmertemperatur, als die Aufbewahrung in Wasser bei sehr niedriger Temperatur (die Frösche bekommen dann Krämpfe oder gar Kältediabetes), auch besser als die Aufbewahrung in einem künstlichen Sumpf aus Torfmoosen und Wasser. Die Frösche, welche in Moos und Kälte gehalten wurden, bekamen nicht die bekannten erisypelartigen Hauterscheinungen, die Sterblichkeit war minimal, sie befanden sich im Schlaf. Einige Tage vor dem Versuch wurden sie bei 5—7° im Moos gehalten.

Die Operation.

Sobald der Frosch in Ätherdämpfen narkotisiert worden ist, wird er auf dem Goltzschen Froschkreuz aufgebunden und so aufgestellt, daß das Tier auf dem Rücken liegt und dabei leicht die linke Seite nach oben hebt. Die Haut wird in 8 mm Entfernung rechts von der Mittellinie durch einen 25 mm langen Schnitt durchschnitten, dann die Muskeln; der Pylorusteil des Magens wird ergriffen und die Duodenumschlinge mit Pankreas und Milz hervorgeholt; dabei auch derjenige Leberlappen umgedreht und hervorgeholt, mit welchem der Leberfortsatz des Pankreas zusammenhängt: die hervorgeholten Organe werden auf mit Ringerlösung befeuchteter Watte gebettet, mit welcher der Schnitt umgeben worden ist.

Da im Winter der Verdauungstractus untätig ist, so habe ich keine Bedenken getragen, ihn zu anämisieren: es wurde nicht nur die V. portae abgebunden, welche im Pankreas verläuft, sondern auch die A. mesenterica. Dadurch wird die Hyperämie vermieden, welche nach Abbindung der Pfortader auftritt. Die Leber wird durch die V. abdominalis und die A. hepatica reichlich mit Blut versorgt. Nachdem die genannten Gefäße im Mesenterium zwischen Milz und Pankreas abgebunden sind, wird der Processus hepaticus hoch und sorgfältig abgebunden, dann werden die Gefäße durchschnitten und das Pankreas mit den Fingern vom Magen und Darm abgerissen, von der Leber losgeschnitten. Muskeln und Haut werden sorgfältig zugenäht.

Man bringt die Frösche durch den luftreichen Wasserstrom unter einer Luftpumpe am schnellsten zum Bewußtsein. Sie werden dann weder auf Eis, wie von Pflüger und von Loewit empfohlen, noch in fließendem Wasser gehalten, sondern bei 6—7° im Moos. Sie befanden sich vorzüglich, die Wunden heilten schnell; nach dem Verlauf von drei Wochen konnten Frösche in bester Verfassung in den Versuch genommen werden.

Glucosurie wurde am dritten Tag durch quantitative Zuckerbestimmung nach der letzten Methode von Bang (Kupfer-Kaliumjodatmethode) festgestellt. 0,5 ccm Harn wurden mit der Bangschen Lösung ($CuSO_4$, KCl) auf 25 ccm aufgefüllt, in 10 ccm wurde dann reduziert und titriert; die Werte wurden an einer eigens angefertigten Eichungskurve abgelesen.

Wenn die Frösche im Moos gehalten werden, so erzeugen sie wenig Harn und verlieren nicht viel Zucker. Um Glucosurie (resp. Diabetes) festzustellen, brachte ich den Frosch bei derselben Temperatur (6—7°) in Wasser: dann scheidet er eine Harn- und Zuckermenge aus, die mehr als zehnmal so groß ist. Der Harn wird mit einer Pipette aus der Blase entnommen. So wurde der am 2. XII. operierte Frosch in fast trockenem Moos gehalten, er schied am 9. XII. 0,4 ccm Harn mit 0,93 mg Glucose aus. Der Harn aus 8 normalen Fröschen reduzierte damals entsprechend 0,12 mg Glucose im Kubikzentimeter. Derselbe pankreaslose Frosch wurde bei 7° im Wasser gehalten und schied am 11. XII. 3,4 ccm Harn mit 7 mg Glucose aus, am 12. XII. 5 ccm Harn mit 6,64 mg Glucose.

Für die Muskelversuche wurden solche Frösche verwendet, welche 7—21 Tage lang Glucosurie hatten, und bei welchem nach der Tötung vollständiges Fehlen des Pankreas festgestellt wurde.

Die Versuche.

I. Der Kohlenhydratverbrauch des ruhenden Muskels.

16. XII. Die Frösche sind am 2. XII. operiert worden. Die Hinterbeine wurden in Sauerstoff aufgehängt, nachdem die einen Gastrocnemien als Kontrollen entnommen worden sind.

a) Kontrolle: Gewicht 1,16 g, Kohlenhydratgehalt: 14,6 mg, d. h. 1,26%. Der Muskel, welcher 30 Stunden in Sauerstoff gehangen hat, enthält 13,7 mg, d. h. 1,18% Kohlenhydrat.

b) Kontrolle: Gewicht 1,28 g, enthält 18 mg Kohlenhydrat, entsprechend 1,41%. Nach 30 Stunden 17,3 mg, entsprechend 1,35% Kohlenhydrat.

Es wurde also ein Ruheverbrauch gefunden, der 0,07% des Muskelgewichtes in der Zeit von 30 Stunden beträgt und von ähnlicher Größenordnung ist wie der Ruheverbrauch normaler Muskeln. (0,05, 0,07, 0,05, 0,045%.)

II. Milchsäurebildung.

a) In der Wärmestarre: Der Frosch ist am 4. XII. operiert worden; der Versuch wurde am 18. XII. vorgenommen. Die Milchsäure wurde nach dem Verfahren bestimmt, welches von Parnas (1914) sowie von Parnas und Laska-Mintz[1]) beschrieben worden ist: Extraktion des Gewebes mit gesättigter Ammonsulfatlösung, Ausäthern, Oxydation der Milchsäure zu Aldehyd und Bindung des Aldehyds an gemessenes Bisulfit. Jodometrische Bestimmung des unverbrauchten Bisulfits.

Wärmestarre: 1,36 g Muskel; der Milchsäuregehalt entspricht 8,57 ccm Jod (0,01 n), entsprechend 0,322% Milchsäure.

Frischer Muskel: 3,290 g; der Milchsäuregehalt entspricht 1,45 ccm (0,01 n) Jod, entsprechend 0,02% Milchsäure.

Der Ruhegehalt und der maximale Gehalt des erstarrten Muskels an Milchsäure ist folglich im pankreasdiabetischen Tier genau so wie im normalen.

III. Milchsäurebildung und Zuckerzersetzung bei anoxybiotischer Arbeit.

a) Operation 16. XII. Versuch; 28. XII.

Ruhewerte: 0,94 g Fleisch (Gastrocnemius) enthalten 12,45 mg Kohlenhydrate entsprechend 1,325%. 2,81 g Fleisch (Oberschenkel) enthalten 0,49 mg Milchsäure, entsprechend 0,027%.

Nach völliger Ermüdung durch Tetanisieren in Wasserstoffatmosphäre:

0,94 g Muskel (Gastrocnemius) enthalten 10,65 mg Kohlenhydrat, entsprechend 1,14%.

2,76 g Fleisch (Oberschenkel) verbrauchen 8,38 ccm 0,01 μ Jod, entsprechend 4,44 mg oder 0,162% Milchsäure.

b) Operiert am 14. I. Versuch am 5. II.

Der eine Gastrocnemius wurde in Wasserstoffatmosphäre ermüdet, seine Zuckungen wurden isometrisch aufgeschrieben. Der symmetrische Muskel arbeitete in Sauerstoff; die Spannung ist auf der gleichen Tafel aufgezeichnet. (Tafel I.)

Gewicht der Muskeln: 1 g. Beide wurden auf Milchsäure analysiert.

[1]) Diese Zeitschr. **116**, 64.

Der anærob ermüdete Muskel enthielt Milchsäure, entsprechend 4,79 ccm 0,01 n Jod, d. h. 0,248%. Der Muskel, welcher in Sauerstoff gearbeitet hatte, enthielt Milchsäure, entsprechend 0,57 ccm 0,01 n Jod, d. s. 0,03%.

Die Versuche vom 28. XII. und 5. II. zeigen, daß die Fähigkeit, Kohlenhydrate in Milchsäure zu verwandeln, die Äquivalenz der zersetzten Kohlenhydrate und der gebildeten Milchsäure unter anæroben Bedingungen sowie die Milchsäureverbrennung im Sauerstoff bei pankreaslosen Fröschen genau die gleiche ist wie bei normalen.

IV. Die Erholungsatmung anærob ermüdeter Muskeln.

9. I. Der Frosch ist am 28. XII. operiert worden. Der eine Gastrocnemius wurde durch 28′ langes indirektes Tetanisieren ermüdet, der andere war frisch. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Barcrofftmanometern und im Respirationsgläschen nach Parnas gemessen. Temperatur 16°.

Nach 24 Stunden sind die Atmung des ermüdeten und die des unermüdeten Muskels gleich geworden. Während 27 Stunden 10′ verbrauchten die Muskeln (0,84 g Gewicht):

Ungereizt: 0,283 mg, d. i. 0,0337% O_2,
Ermüdet: 1,32 mg, d. i. 0,157 % O_2.

Also auch die Erholungsatmung der Muskeln ist bei pankreaslosen Tieren die gleiche wie bei normalen Tieren.

V. Der Kohlenhydratschwund bei oxybiotischer Arbeit.

Die Versuche wurden genau so durchgeführt, wie in der vorhergehenden Mitteilung für normale Muskeln beschrieben worden ist. Als Vorversuche seien solche angeführt, in welchen die Arbeit nicht gemessen worden ist, die Muskeln alle 8—12″ gereizt wurden und der Versuch dann abgebrochen wurde, als die Zuckungen deutlich schwächer wurden.

a) Versuch 6. XII., operiert am 27. XI. Der Versuch dauerte 32 Stunden, der Muskel zuckte 10 000—12 000 mal. Gewicht des Muskels: 1,22 g.

Der Kontrollmuskel enthält 20,5 mg, d. i. 1,66% Kohlenhydrate. Nach der Arbeit enthält der Muskel 15,3 mg Kohlenhydrat; der Verlust beträgt folglich 5,2 mg, d. i. 0,43% des Muskelgewichts.

b) 8. XII. Operiert am 27. XI.

Der Versuch dauerte 27 Stunden. Das Muskelgewicht beträgt 1,45 g (Gastrocnemius).

Der Kontrollmuskel enthält 18,3 mg Kohlenhydrat, d. i. 1,26%; nach der Arbeit 14,6 mg, d. i. 1,01%. Der Kohlenhydratverlust beträgt folglich 3,7 mg oder 0,25%.

Sartorius desselben Frosches. Reizung aller 6″, Unterbrechung durch eine Bowditchuhr. Der Versuch dauerte 32 Stunden, der Muskel zuckte

18000mal. Als der Versuch unterbrochen wurde, war die Contractilität noch ausgezeichnet, die Erregbarkeit dagegen sehr herabgesetzt.

Der Kontrollmuskel (226 mg) enthält 2,9 mg, d. i. 1,29% Kohlenhydrat. Nach der Arbeit 1,1 mg, d. i. 0,49% Kohlenhydrat.

Die Angaben über diejenigen Versuche, in welchen sowohl die geleistete Arbeit als auch der Kohlenhydratverbrauch gemessen worden ist, sind in der Tabelle I und den Tafeln 2, 3, 4 enthalten.

Die Versuchsdaten zeigen klar, daß zwischen dem Kohlenhydratverbrauch isolierter, arbeitender Muskeln pankreasloser und normaler Tiere kein Unterschied besteht. Der mechanische Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung ist bei dem Muskel des pankreaslosen Frosches geringer als beim normalen. Wenn die Muskeln aus einer anderen Energiequelle

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Datum des Versuches	Art des Muskels	Datum der Operation	Gewicht des Muskels g	Länge des Muskels cm	Abstand eines Reizes vom anderen Sekd.	Glykogengehalt der Leber %	Kohlenhydratgehalt des Kontrollmuskels mg	Kohlenhydratgehalt des Muskels nach der Arbeit mg	Abnahme des Kohlenhydratgehalts mg	Abnahme des Kohlenhydratgehalts korrigiert für den Ruheverbrauch mg	Die Wärmemenge, welche dem Kohlenhydratverbrauch entspricht cal	Die Wärmemenge, welche dem korrigierten Kohlenhydratverbrauch entspr. cal	Zahl der Zuckungen · 10^3	Entwickelte Spannung g · 10^4	Maximale Arbeit in cal	Mechanischer Wirkungsgrad nach Kol. 16 u. 12 %	Mechanischer Wirkungsgrad nach Kol. 16 u. 13 %	Dauer des Versuchs
10. XII.	Gastrocnemius	2. XII.	1,31	4,0	6 dann 12	1	23,2	17,5	5,8	4,4	22	16,7	17,75	3,92	3,58	16,2	27	46h
3. I.	Gastrocnemius	23. XII.	1,15	3,9	12	—	11,6	9	2,6	1,8	10	7	4,450	2,61	2,39	23,9	34	30h
9. I.	Gastrocnemius	28. XII.	7,42	3,9	12	1,3	26,4	18,6	5,8	5,02	22	19,1	6,933	3,96	3,67	16,7	19,2	31h

Der anærob ermüdete Muskel enthielt Milchsäure, entsprechend 4,79 ccm 0,01 n Jod, d. h. 0,248%. Der Muskel, welcher in Sauerstoff gearbeitet hatte, enthielt Milchsäure, entsprechend 0,57 ccm 0,01 n Jod, d. s. 0,03%.

Die Versuche vom 28. XII. und 5. II. zeigen, daß die Fähigkeit, Kohlenhydrate in Milchsäure zu verwandeln, die Äquivalenz der zersetzten Kohlenhydrate und der gebildeten Milchsäure unter anæroben Bedingungen sowie die Milchsäureverbrennung im Sauerstoff bei pankreaslosen Fröschen genau die gleiche ist wie bei normalen.

IV. Die Erholungsatmung anærob ermüdeter Muskeln.

9. I. Der Frosch ist am 28. XII. operiert worden. Der eine Gastrocnemius wurde durch 28′ langes indirektes Tetanisieren ermüdet, der andere war frisch. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Barcrofftmanometern und im Respirationsgläschen nach Parnas gemessen. Temperatur 16°.

Nach 24 Stunden sind die Atmung des ermüdeten und die des unermüdeten Muskels gleich geworden. Während 27 Stunden 10′ verbrauchten die Muskeln (0,84 g Gewicht):

Ungereizt: 0,283 mg, d. i. 0,0337% O_2,
Ermüdet: 1,32 mg, d. i. 0,157 % O_2.

Also auch die Erholungsatmung der Muskeln ist bei pankreaslosen Tieren die gleiche wie bei normalen Tieren.

V. Der Kohlenhydratschwund bei oxybiotischer Arbeit.

Die Versuche wurden genau so durchgeführt, wie in der vorhergehenden Mitteilung für normale Muskeln beschrieben worden ist. Als Vorversuche seien solche angeführt, in welchen die Arbeit nicht gemessen worden ist, die Muskeln alle 8—12″ gereizt wurden und der Versuch dann abgebrochen wurde, als die Zuckungen deutlich schwächer wurden.

a) Versuch 6. XII., operiert am 27. XI. Der Versuch dauerte 32 Stunden, der Muskel zuckte 10 000—12 000 mal. Gewicht des Muskels: 1,22 g.

Der Kontrollmuskel enthält 20,5 mg, d. i. 1,66% Kohlenhydrate. Nach der Arbeit enthält der Muskel 15,3 mg Kohlenhydrat; der Verlust beträgt folglich 5,2 mg, d. i. 0,43% des Muskelgewichts.

b) 8. XII. Operiert am 27. XI.

Der Versuch dauerte 27 Stunden. Das Muskelgewicht beträgt 1,45 g (Gastrocnemius).

Der Kontrollmuskel enthält 18,3 mg Kohlenhydrat, d. i. 1,26%; nach der Arbeit 14,6 mg, d. i. 1,01%. Der Kohlenhydratverlust beträgt folglich 3,7 mg oder 0,25%.

Sartorius desselben Frosches. Reizung aller 6″, Unterbrechung durch eine Bowditchuhr. Der Versuch dauerte 32 Stunden, der Muskel zuckte

18 000 mal. Als der Versuch unterbrochen wurde, war die Contractilität noch ausgezeichnet, die Erregbarkeit dagegen sehr herabgesetzt.

Der Kontrollmuskel (226 mg) enthält 2,9 mg, d. i. 1,29% Kohlenhydrat. Nach der Arbeit 1,1 mg, d. i. 0,49% Kohlenhydrat.

Die Angaben über diejenigen Versuche, in welchen sowohl die geleistete Arbeit als auch der Kohlenhydratverbrauch gemessen worden ist, sind in der Tabelle I und den Tafeln 2, 3, 4 enthalten.

Die Versuchsdaten zeigen klar, daß zwischen dem Kohlenhydratverbrauch isolierter, arbeitender Muskeln pankreasloser und normaler Tiere kein Unterschied besteht. Der mechanische Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung ist bei dem Muskel des pankreaslosen Frosches geringer als beim normalen. Wenn die Muskeln aus einer anderen Energiequelle

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	18	14	15	16	17	18	19
Datum des Versuches	Art des Muskels	Datum der Operation	Gewicht des Muskels	Länge des Muskels	Abstand eines Reizes vom anderen	Glykogengehalt der Leber	Kohlenhydratgehalt des Kontrollmuskels	Kohlenhydratgehalt des Muskels nach der Arbeit	Abnahme des Kohlenhydratgehalts	Abnahme des Kohlenhydratgehalts korrigiert für den Ruheverbrauch	Die Wärmemenge, welche dem Kohlenhydratverbrauch entspricht	Die Wärmemenge, welche dem korrigierten Kohlenhydratverbrauch entspr.	Zahl der Zuckungen · 10^3	Entwickelte Spannung	Maximale Arbeit	Mechanischer Wirkungsgrad nach Kol. 16 u. 12	Mechanischer Wirkungsgrad nach Kol. 16 u. 18	Dauer des Versuchs
			g	cm	Sekd.	%	mg	mg	mg	mg	cal	cal		g · 10^3	in cal	%	%	
10. XII.	Gastrocnemius	2. XII.	1,31	4,0	6 dann 12	1	23,2	17,5	5,8	4,4	22	16,7	17,75	3,92	3,58	16,2	27	46^h
3. I.	Gastrocnemius	23. XII.	1,15	3,9	12	—	11,6	9	2,6	1,8	10	7	4,450	2,61	2,39	23,9	34	30^h
9. I.	Gastrocnemius	28. XII.	7,42	3,9	12	1,3	26,4	18,6	5,8	5,02	22	19,1	6,933	3,96	3,67	16,7	19,2	31^h

schöpfen würden als aus den Kohlenhydraten, so wäre der Wirkungsgrad im Gegensatz dazu höher als beim normalen Tier.

Bemerkungen zur Theorie der Diabetes.

Es gelang mir keinen Unterschied zu finden zwischen der Kohlenhydratzersetzung sowie der Kohlenhydratverbrennung in isolierten Muskeln normaler und pankreasloser diabetischer Frösche; und in der gesamten Literatur dieses Gebietes sehe ich keine einzige Tatsache, welche das Bestehen eines solchen Unterschiedes — auch bei anderen Tieren — wirklich beweisen würde. Der Muskel scheint in der Mobilisierung und im Verbrauch seiner Kohlenhydratvorräte ganz selbständig zu sein: dieses bezieht sich sowohl auf normale Muskeln als auch auf solche, welche längere Zeit hindurch nicht mehr mit dem Pankreas im Zusammenhang sind.

Wir müssen einen Einwand betrachten, welchen Forschbach und Schaeffer gegen alle Versuche erhoben haben, die an isolierten Muskeln ohne Kreislauf und ohne Zusammenhang mit anderen Organen die hier erörterten Fragen zu entscheiden suchen. Nach Forschbach und Schaeffer kann der isolierte Muskel eines pankreaslosen Tieres die Fähigkeit haben, Zucker zu verbrennen, obwohl er diese Fähigkeit nicht besaß, solange er sich im Organismus befand. Die Anpassung des Fermentmechanismus an die Bedürfnisse des Organismus erfordert eine gewisse Regulierung, und diese Regulierung wird durch Veränderungen derjenigen Agenzien bewirkt, welche die Wirksamkeit der Fermente beeinflussen. Die Aufgabe der inneren Sekretion besteht darin, diese Veränderungen hervorzurufen. Wenn der Energiebedarf in den Muskeln steigt, so „wirken sie auf den Fermentmechanismus in ihrer Gesamtheit im Sinne einer Förderung"; wenn der Muskel ruht, so wirken sie hemmend oder verbleiben inaktiv. Wenn ihr Zusammenwirken durch Ausfall eines fördernden Bestandteiles gestört wird, so überwiegt die hemmende Wirkung: dieser Zustand soll eben beim pankreaslosen Tier bestehen; wenn der Muskel aber aus dem Organismus des diabetischen Tieres entnommen wird, so befindet er sich in dem gleichen Zustand, wie wenn er aus dem normalen Organismus entnommen wäre, er ist in beiden Fällen außerhalb der Wirkung hemmender und fördernder Stoffe. Nur der im Muskel enthaltene

Fermentmechanismus ist dann für den Kohlenhydratabbau maßgebend; und Forschbach und Schaeffer sagen, es sei nicht zu verstehen, wie die Pankreasexstirpation eben diesen Fermentmechanismus beeinflussen sollte.

Dies ist die Anschauung von Forschbach und Schaeffer; ich sehe aber die Grundlagen nicht, auf welche die Lehre von einer Beeinflussung der Regulierung des Muskelkohlehydratverbrauchs für die Arbeit dieses Muskels durch „Hormone" gestützt werden könnte. Sowohl der Muskel wie das Herz erweisen sich in der Ausnutzung ihrer Kohlenhydrate als ganz selbständig, und es besteht zur Zeit keine Notwendigkeit für die Anpassung der Mobilisation und der Zersetzung von Kohlenhydraten im Muskelgewebe an die Bedürfnisse andere wirksame Faktoren anzunehmen, als die Änderungen, welche im Gewebe selber zufolge der Tätigkeit eintreten.

In den Versuchen, welche hier sowie in der vorhergehenden Arbeit beschrieben worden sind, ist die Frequenz der Zuckungen, die keine Ermüdung hervorruft, die gleiche, wie die optimale, nicht ermüdende Frequenz der Kontraktionen nicht isolierter, physiologisch durchbluteter Froschmuskeln in den Versuchen von Weiss und Cervello.

Meine Versuche zeigen überdies, wie genau die Einrichtungen, welche sowohl im normalen wie dem „diabetischen" Muskel enthalten sind, den Verbrauch an Kohlenhydraten dem Energiebedarf anpassen. Die Annahme, daß der Verbrauch durch „Hormone" beeinflußt wird, die von außerhalb des Muskels kommen, unbegründet und keineswegs unentbehrlich ist. Der Verbrauch wird durch die Tätigkeit geregelt, die Tätigkeit durch nervöse Einflüsse. Es ist hier selbstverständlich nur von der willkürlich innervierten Tätigkeit die Rede, nicht vom Tonus.

Der Muskel ist in der Ausnutzung seiner Kohlenhydratvorräte selbständig, solange er voll überlebt; die Überlebensdauer scheint von der Arbeit, die er leistet, unabhängig zu sein, soweit er ohne Ermüdung (d. h. Anhäufung von Ermüdungsprodukten) und ohne Erschöpfung (d. h. Aufbrauchung seiner Vorräte) arbeitet. In der bisherigen Muskelphysiologie, die sich vorwiegend mit asphyktischen Muskeln beschäftigte, wurde das Entgegengesetzte angenommen: daß ein arbeitender Muskel kürzer überlebt als ein ruhender.

Für das Überleben des isolierten Muskels durch längere Zeit erscheint indessen die Mitwirkung von Faktoren notwendig zu sein, welche dem Muskel von anderen Geweben zugeführt werden müssen. Ich sehe hier von der Ergänzung der verbrauchten Vorräte und dem Schutz vor Infektion ab: ich habe nur diejenigen Faktoren im Auge, welche für die Erhaltung der inneren Struktur des Muskels notwendig sind. Vielleicht ist dazu ein Sekret der Nebenniere oder des Pankreas notwendig: wir vermögen darüber nichts auszusagen. Jedenfalls arbeitet die Muskelstruktur noch sehr lange, nachdem der Muskel aus dem Organismus entfernt worden ist oder das Pankreas beseitigt: und so lange sie arbeitet, so lange kann sie auch Kohlenhydrate verbrennen.

Die Verhältnisse liegen beim Muskel ganz anders als bei der Leber: die Kohlenhydratvorräte dieses Gewebes bilden eine zweite Bereitschaft der Muskeln, und ihre Beständigkeit oder Mobilisierung wird mittels eines Mechanismus reguliert, in welchem chemische Reize eine Rolle spielen. Lesser[1]) hat nachgewiesen, daß die Pankreasexstirpation beim Frosch eine Verstärkung der Glykogenhydrolyse in der Leber bedingt; wir wissen nicht, ob dies infolge Fehlens eines chemischen Agars eintritt, welches der Leber die Erhaltung des Glykogens ermöglicht, oder eines solchen, welches die Adrenalinwirkung aufhebt, welche die Glykogenhydrolyse in der Leber fördert.

Glykogen und Traubenzucker gehen ineinander in einer Reaktion über, welche sehr wenig Wärme entbindet oder bindet. Wenn Glykogen und Wasser in solchen molekularen Verhältnisse nebeneinander vorhanden sind, wie dies in den Zellen der Fall sein kann, so müßte das Gleichgewicht völlig nach der Seite des Traubenzuckers verschoben sein. Wenn Schollen einer konzentrierten wässerigen Glykogenlösung in der Leberzelle beständig sind, so kann dies auf einem falschen Gleichgewicht beruhen, auf der Abwesenheit von Katalysatoren, oder Anwesenheit negativ katalysierender (hemmender) Faktoren. Aber entstehen können solche Glykogenschollen nur durch innere Arbeit der Leberzelle, und diese Arbeit kann sehr viel größer sein als die Energiemenge, welche durch die Reaktion $n \cdot H_2O$ + Glykogen $\rightleftharpoons$ n (Traubenzucker) gebunden oder entwickelt wird: ebenso wie die innere Arbeit der Nierenepithelien sehr viel größer ist als die osmotische

[1]) Diese Zeitschr. 55, 355. 1913.

Arbeit, die sie leisten. Vielleicht ist für die Leistung dieser inneren Arbeit, von welcher die scheinbar statische, in Wirklichkeit dynamische Beständigkeit des Glykogens in der Leberzelle abhängt, irgendein Faktor notwendig, der vom Pankreas herrührt.

Unter den Versuchen, welche für eine Herabsetzung der Zuckerverbrennung im Diabetes sprachen, traten in den letzten Jahren die Versuche von F. Verzar und Fejer[1]) hervor. Verzar hatte gezeigt, daß bei normalen curarisierten Hunden die Infusion von Traubenzucker stets eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten zur Folge hat, die Verbrennungen werden überhaupt gesteigert, als ob das erhöhte Angebot an Traubenzucker einen erhöhten Verbrauch zur Folge hätte. Bei pankreaslosen Tieren bleibt dieser Effekt aus, sobald der Diabetes voll entwickelt ist. In den ersten Tagen nach der Exstirpation tritt noch der Verzar-Effekt auf. Dann verschwindet er; die Erhöhung der Verbrennungen und des Respirationsquotienten nach Infusion von Laevulose tritt noch auf, wenn er nach Glucoseinfusion nicht mehr auftritt, dann schwindet er auch.

Versuchen wir zu überlegen, was die Versuche von Verzar und Fejer eigentlich aussagen, so ist zunächst auf einen Punkt aufmerksam zu machen: der Überschuß der Verbrennungen über den Ruhewert in der Zeit, in welcher der Respirationsquotient erhöht erscheint, entspricht der Verbrennung eines kleinen Teiles, etwa 10% der infundierten Zuckermenge. Sollte dies nicht gerade die Zuckermenge sein, welche verbrannt werden muß, damit die Energie für die innere Arbeit geliefert werde, welche für die Konzentrierung und Festlegung des Glykogens als Zucker notwendig ist?

Dieser Vorgang spielt sich vorwiegend, vielleicht ausschließlich in der Leber ab. Die Leber ist in erster Linie dasjenige Gewebe, welches überschüssigen Zucker aufnimmt; sie ist auch das einzige Organ (von Leukocyten und Verdauungsorganen abgesehen), von welchem wir wissen, daß es auf Berührung mit dem zu verarbeitenden Material mit erhöhter Aktivität reagiert. Für Traubenzucker ist dies besonders von Ed. Freise gezeigt worden; in der künstlich durchbluteten Leber steigt die Kohlensäureproduktion besonders stark an, wenn Traubenzucker zugesetzt wird. Embden und Isaak haben die, auch in diesem Zusam-

[1]) Diese Zeitschr. 53, 140. 1913.

menhang sehr wichtige, Tatsache gefunden, daß die normale, künstlich durchblutete Hundeleber Glucose und Laevulose zu Milchsäure umsetzt, daß dagegen die diabetische Hundeleber diese Fähigkeit nicht mehr besitzt; in einem gewissen Zeitpunkt vor der völligen Entwicklung des Diabetes kann noch Laevulose, aber nicht mehr Glucose zersetzt werden: es besteht hier das gleiche Verhältnis zwischen beiden Kohlenhydraten wie nach den Versuchen von Verzar.

Bei dem Muskelgewebe fehlt eine Erhöhung des Stoffwechsels als Reaktion auf das vergrößerte Angebot des wichtigsten Betriebsstoffes. Der Stoffwechsel im Muskel hängt während der Ruhe von der Temperatur, wahrscheinlich von der Jahreszeit und von dem inneren Zustand des Gewebes ab; während der Tätigkeit hängt er mit der Intensität der Tätigkeit (mit der erzeugten Spannung) zusammen. Es mag ja sein, daß die Anhäufung von Glykogen im Muskel auch Arbeit und erhöhten Stoffumsatz forderter, und daß während des Speicherns auch die Zuckerverbrennung erhöht ist; aber die Glykogenspeicherung im Muskel ist jedenfalls ein — im Verhältnis zur Speicherung in der Leber — langsam verlaufender und geringfügiger Prozeß. Es sei hier nochmals die wichtige, von Landsberg ermittelte Tatsache erwähnt, daß der Zuckerverbrauch des Muskels aus dem durchfließenden Blut von der Hyperglykämie nicht beeinflußt wird.

Aus den hier angeführten Gründen glaube ich, daß die Mehrverbrennung von Zucker, die von Verzar und seinem Mitarbeitern als Folge von Zuckerinfusion beobachtet worden ist, in der Leber stattfindet. Insbesondere auch deshalb, weil die Muskeln in diesen Versuchen durch Curare stillgelegt worden sind. Wenn sich die Sache so verhält, so hängt das Ausbleiben des Effektes bei pankreaslosen Tieren mit der Unfähigkeit zusammen, Glykogen zu speichern; also mit einer Eigenschaft, welche so oft bei der diabetischen Leber festgestellt worden ist und mit der Leberverfettung, der Einstellung des Stoffwechsels auf Fettverbrennung zusammenhängt.

So möchte ich die Ergebnisse von Verzar deuten; und im Zusammenhang mit den hier beschriebenen Tatsachen sehe ich keinen Grund für die Behauptung, daß Muskeln diabetischer Tiere einen anderen Stoffwechsel hätten als normale Muskeln, daß sie unfähig sein sollten, Kohlenhydrate zu zerlegen und als

Betriebsstoff bei der Arbeit zu verwenden. Als eines der gewichtigsten Argumente betrachte ich die Tatsache, daß das Verhältnis $\frac{D}{N}$ im Pankreasdiabetes und im menschlichen Diabetes viel geringer ist als bei tiefer Phlorizinglucosurie.

Es wird notwendig sein, den Kohlenhydratumsatz des „diabetischen" Muskels, wie er hier am Frosch untersucht worden ist, auch am warmblütigen Tier zu prüfen. Wahrscheinlich wird dies in der Weise geschehen müssen, daß an einem kleinen Muskel eines großen Tieres zugleich die Arbeit, der Zuckerschwund aus dem fließenden Blute und der Schwund von Kohlenhydratvorräten durch Vergleich mit dem symmetrischen ruhenden Muskel untersucht wird.

Über den mechanischen Wirkungsgrad der in isolierten Amphibienmuskeln stattfindenden Verbrennungsprozesse[1].

(Vorläufige Mitteilung.)

Von

Jakob K. Parnas.

(Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Warschau.)

(Eingegangen am 30. Dezember 1920.)

Mit 1 Tafel und 1 Abbildung im Text.

In einer vorhergehenden Mitteilung[2]) habe ich den mechanischen Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung in isolierten Froschmuskeln behandelt. Es wurde das Verhältnis der maximalen Arbeit der isometrisch gespannten Muskeln zu dem gleichzeitigen Kohlenhydratschwund bestimmt; die potentielle Energie der Spannung wurde in Tausenden von Zuckungen erzeugt, die so geleitet wurden, daß der Muskel nicht ermüdete, seinen Zustand unverändert beibehielt und nur an Kohlenhydraten verarmte. Es wurde auf Grund früherer Untersuchungen angenommen, daß die verschwindenden Kohlenhydrate vollständig zu Kohlensäure und Wasser verbrennen. Der gefundene mechanische Wirkungsgrad beträgt in Gastrocnemien 24,3—36% der umgesetzten chemischen Energie, für Sartorien nahezu 50%.

Es wurden bereits in jener Arbeit die Ziele der Versuche erörtert, über die jetzt zu berichten ist. Es handelt sich darum, den mechanischen Wirkungsgrad des isolierten Muskels in langen Reihen von Erholungs-Ermüdungs-Kreisprozessen zu bestimmen, wobei der gesamte Stoffwechsel sowohl der Ermüdungs- als der Erholungsprozesse mitbestimmt würde.

---

[1]) Der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Warschau vorgelegt im Juni 1919.

[2]) C. r. **103**, 1037.

Solche Versuche sind bis jetzt nicht ausgeführt worden; ihnen am nächsten stehen die Versuche von Chauveau und Kauffmann[1]), die sich nicht auf isolierte, sondern bei erhaltenem Blutkreislauf mechanisch abgesonderte Muskeln beziehen. In den Versuchen von Hill[1]) wurde bei Bestimmung des Wirkungsgrades nur die Ermüdungswärme experimentell bestimmt, die Erholungswärme wurde auf Grund anderer Versuche in Rechnung gestellt.

Für die Zwecke der gegenwärtigen Untersuchung kamen zwei Wege in Frage, den gesamten Energieumsatz zu bestimmen: man konnte ihn entweder calorimetrisch oder auf Grund des Sauerstoffverbrauches messen. Calorimetrische Bestimmungen wären hier die sicherste Grundlage; aber ein genügend empfindliches und gut isoliertes Calorimeter, aus welchem man die Muskelzuckungen herausleiten und aufschreiben könnte, ist wohl schwer zu konstruieren. Selbst die Bestimmung des Sauerstoffverbrauches bei gleichzeitiger Registrierung der erzeugten Spannung war keine einfache Aufgabe, doch ließ sie sich lösen.

Die Schwierigkeiten beruhten darin, daß die Muskelkammer Gasdichtigkeit und eine Vorrichtung verbinden mußte, die es ermöglichte, die Spannung der zuckenden Muskeln zu messen. Für die Messung des Sauerstoffverbrauches kam von vornherein nur die manometrische Messung als die einzige genügend empfindliche in Frage; diese verlangte aber nicht nur eine gasdichte Kammer, sondern auch ein unveränderliches Kammervolumen.

Ich habe eine Kammer angegeben, welche oben und unten durch Schieber verschlossen ist; diese Schieber bewegen sich dicht in vorzüglich angepaßten Stopfbüchsen und sind durch leichtes Knochenöl abgedichtet. Die Vorrichtung ist völlig gasdicht, die Schieber dabei so beweglich, daß durch den oberen Schieber der Muskel mit dem isometrischen Muskelhebel nach Bürker verbunden werden kann und seine Spannung geschrieben werden kann. Der untere Schieber dient dazu, um dem Muskel die gewünschte Grundspannung zu erteilen. Sollte der Gasdruck in der Kammer an dem mit ihr verbundenen Barcrofft-Manometer abgelesen werden, so brachte man beide Schieber in eine Lage, die ein für allemal bestimmt war, und bei der das Volumen der Kammer bekannt war.

Der Bau der Kammer geht aus der Zeichnung hervor. Sie enthält einen geräumigen Behälter, der durch eine weite Öffnung mit ihr verbunden, mit Paraffin bedeckt ist, und auf Glaswolle 10 % Kalilauge enthält. Ein zweiter seitlicher Tubus enthält die Elektroden, die zur Reizung des Nerven

[1]) Journ. of physiol. 46, 435.

dienen; unten ist ein Hahn angesetzt, durch welchen bei offenem Manometerhahn die Kammer mit Sauerstoff gefüllt werden kann. Die Schieberbüchsen sind mit Picein in Glasröhren eingekittet, die das abdichtende Öl enthalten. Am Boden der Kammer befindet sich Ringerlösung, welche in einem Stück Filtrierpapier emporsteigt und die Luftfeuchtigkeit bestimmt.

Die Unterbringung des Muskels in der Kammer, die Reizung und Aufzeichnung der Spannung, die Belastung oder Spannung der Muskeln, die Eichung des Apparates — alles wird genau so durchgeführt, wie bei der früher beschriebenen Kammer. Eine zweite Kammer, die mit der ersten bis auf die beweglichen Schieber und die Elektroden identisch ist, enthält den symmetrischen Kontrollmuskel. Die beiden Kammern konnten infolge glastechnischer Schwierigkeiten und der Unbequemlichkeit, mit einem so komplizierten Doppelapparat zu arbeiten, nicht mit einem gemeinsamen Wassermantel umgeben werden. Während des Versuches stehen beide Kammern mit ihren Manometern nebeneinander auf dem Tisch, von Wärmequellen entfernt und geschützt; für die Ablesungen des Gasdruckes aber wird die Arbeitskammer von dem Muskelheber abgelöst, die Schieber in die richtige Lage gebracht und mittels Wachs darin fixiert, dann werden beide Kammern in ein gut gerührtes Wasserbad gebracht und nach 20′ der Gasdruck abgelesen.

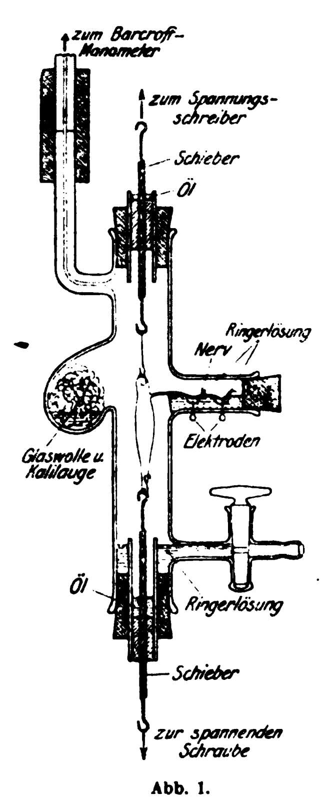


Abb. 1.

Das Volumen der Kammer beträgt 54 ccm; wenn sie den Muskel, 2 ccm Lauge, Öl und Ringerlösung enthält, so beträgt das Gasvolumen 48 ccm. Das gleiche gilt für die Kontrollkammer. Die Senkung des Gasdruckes um 1 mm Brodiesche Gallenlösung (spez. Gew. 1,034) entspricht dem Verbrauch von 4,8 cmm Sauerstoff, also 0,006 mg; dies entspricht der Entwicklung von 0,023 cal.

Nachdem der Muskel im Apparat aufgehängt und die Kammer mit Sauerstoff gefüllt ist, wird noch 6 Stunden gewartet, damit sowohl Gewebe als Flüssigkeiten mit Sauerstoff gesättigt werden. Dann lasse ich den Muskel einige Stunden lang arbeiten, um die erste Periode stärkerer Zuckungen hinter sich zu haben und damit in Verbrauch und Zutritt von Sauerstoff zum Muskel eine Art dynamischen Gleichgewichts eintritt: dann arbeitet der Muskel ohne Ermüdung ganz gleichmäßig und wird von der

Oberfläche aus genügend mit Sauerstoff versorgt. In diesem Zeitpunkt beginnen die Messungen von Arbeit und Sauerstoffverbrauch: die Messung wird in mehreren Abschnitten durchgeführt. Ich bringe hier die genaue Beschreibung eines Versuches, dessen graphisches Protokoll hier beigefügt ist; die Ergebnisse anderer Versuche, die in der gleichen Weise durchgeführt worden sind, enthält die Tabelle (s. Tafel III).

Das Gastrocnemius-Nerv-Muskelpräparat einer R. esculenta wurde am 10. III. um 11 Uhr vormittags angefertigt; der Apparat zusammengestellt und der darin aufgehängte Muskel, sowie der symmetrische Kontrollmuskel im Parallelapparat bis 4 Uhr im Sauerstoff gelassen. Dann werden die Schieber freigemacht, in die richtige Lage gebracht, dem Muskel die Spannung von 20 g erteilt und die Reizung durch Öffnungsströme eines großen Schlittenapparates begonnen, dessen primäre Ströme (2 V) mittels einer Bowditchuhr unterbrochen wurden. Alle 20″ erfolgte eine Zuckung, die Reize waren bei einem Rollenabstand von 42 cm maximal. Nach 8 Stunden (12 Uhr nachts) wurden die Schieber arretiert, die Kammer von dem Spannungsmesser gelöst zugleich mit der Kontrollkammer, in ein Wasserbad von konstanter Temperatur eingetaucht und nach 20′ durch Öffnen des Manometerhahnes in beiden Kammern Atmosphärendruck hergestellt. Damit beginnt die eigentliche Messung. Nachdem die Kammer wieder mit dem Hebel verbunden war und die Reizung wieder begonnen hatte, arbeitete der Muskel mit der gleichen Regelmäßigkeit, die ich früher beschrieben hatte. Die während vieler Stunden gleichmäßigen Zuckungen steigen im Laufe des zweiten Versuchstages langsam an.

Es wurden in diesem Versuche drei Abschnitte gemessen:

A. von 11. III. $1^h 20'$ a. m. bis $10^h 10'$ a. m.
B. von 11. III. $11^h 20'$ a. m. bis $4^h 20'$ p. m.
C. von 11. III. $4^h 40'$ p. m. bis 12. III. $12^h 20'$ a. m.

Muskellänge 35 mm; Barometerdruck 746—750 mm. 1. Abschnitt: Reduziertes Gasvolumen 44,78 ccm, Druckabnahme (korrigiert, d. h. vermindert um die Druckabnahme in der Kontrollkommer) beträgt 120 mm. Der Sauerstoffverbrauch beträgt folglich: 0,538 ccm = 0,764 mg.

Dies entspricht bei Annahme von Zuckerverbrennung der Produktion von 2,67 cal.

In diesem Zeitabschnitt hat der Muskel 1620 Zuckungen ausgeführt, deren durchschnittliche Maximalspannung 92 g beträgt. Die maximale Arbeit dieser Spannung beträgt:

$$\frac{1{,}49 \cdot 10^5 \cdot 10^{-4} \cdot 3{,}5}{4{,}26 \cdot 10} = 1{,}25 \text{ cal.}$$

Der mechanische Wirkungsgrad beträgt demnach $\frac{1{,}25}{2{,}67} = 46\%$.

In dem zweiten Arbeitsabschnitt wurden 825 Zuckungen mit der Spannung von je 85,5 g ausgeführt; dies entspricht der maximalen Arbeit

von 0,58 cal. Es nahm der Druck um 55 mm ab, was einem Verbrauch von 0,348 mg O_2, der Produktion von 1,22 cal. entspricht. Der Wirkungsgrad beträgt hier 47%.

Im dritten Abschnitt führte der Muskel 1440 Zuckungen von je 96 g aus, die maximale Arbeit betrug also 1,14 cal. Die Druckabnahme beträgt 119 mm, der Sauerstoffverbrauch 0,84 mg, folglich die Wärmebildung 2,65 cal. Der Wirkungsgrad beträgt hier 43%.

Weitere Ergebnisse enthält die Tabelle:

Datum	Muskellänge	Temperatur der Ablesung	Reduziertes Gasvolumen	Zahl der Zuckungen	Spannung der Zuckung	Summe der entwickelten Spannung · 10^5 g	Max. Arbeit in cal	Druckabnahme in mm	Sauerstoffverbrauch in ccm	Energieproduktion in cal	Wirkungsgrad in %
14. III.	32	15°	44,8	1225	64	0,784	0,65	69	0,44	1,53	42,8
14. III.	32	15°	44,8	980	58	0,578	0,43	46	0,29	1,04	41,3
6. IV.	37	15°	45,1	1480	88	1,30	1,13	116	0,742	2,6	43,5
6. IV.	37	15°	45,1	470	84	0,39	0,343	35	0,224	0,78	44,3
6. IV.	37	15°	45,1	720	92	0,662	0,575	61	0,392	1,37	43,6

Der mechanische Wirkungsgrad beträgt in meinen Versuchen durchschnittlich 44% des aus dem Sauerstoffverbrauch berechneten Energieumsatzes. Ich schreibe diesen Versuchen einen hohen Grad von Genauigkeit zu. Die Empfindlichkeit und Genauigkeit der chemischen Methode, die einfache und eindeutige Abhängigkeit des Energieumsatzes von dem Sauerstoffverbrauch, der gut definierte und gleichbleibende Zustand des Muskels zu Beginn und zu Ende eines jeden Versuchsabschnittes; die Korrektur für Ruheverbrauch durch den parallelen Atmungsversuch am ruhenden symmetrischen Muskel; die Durchführung mehrerer Bestimmungen an dem gleichen Muskel: all dies erteilt diesen Bestimmungen einen höheren Grad von Genauigkeit als anderen Bestimmungen an Einzelmuskeln.

Aus äußeren Gründen konnte ich den Wirkungsgrad an anderen Muskeln nicht mehr bestimmen. Die hier gefundenen Werte liegen dem Wirkungsgrad des Zuckerverbrauchs an Sartorien näher, als an Gastrocnemien. In den Versuchen an Sartorien war indessen der Wirkungsgrad der Kohlenhydratverbrennung mit größerer Exaktheit und Sicherheit bestimmt als an Gastrocnemien, denn es fiel in den ersteren das unsichere Moment des Ruhekohlenhydratverbrauches weniger ins Gewicht als in den letzteren.

Der Vergleich des Wirkungsgrades, der sich aus der Bestimmung des Kohlenhydratverbrauches ergibt, mit demjenigen, der aus dem Sauerstoffverbrauch bestimmt wurde, zeigt, daß der Wirkungsgrad des Sauerstoffverbrauches in keinem Fall geringer ist als der Wirkungsgrad der Kohlenhydratzersetzung. Daraus folgt, daß in isolierten Muskeln, die unter für die Oxydationsvorgänge günstigsten Bedingungen arbeiten, keine andere Energiequelle anzunehmen ist als Kohlenhydratverbrennung.

Über den Stoffwechsel der Amphibienlarven.

Von

Jakob K. Parnas und **Zofia Krasinska.**

[Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Warschau[1]).]

(Eingegangen am 4. Januar 1921.)

Mit 15 Abbildungen im Text.

Die Untersuchung, über welche hier berichtet werden soll, wurde im Jahre 1915 begonnen; der eine von uns verdankte es damals der Gastfreundschaft des Biologisch-Embryologischen Instituts der Universität zu Krakau, daß er seine dienstfreie Zeit wissenschaftlichen Arbeiten widmen konnte. Um in der Arbeitsrichtung der Anstalt zu bleiben, deren Mittel benutzt wurden[2]), begannen wir damals eine Untersuchung über die Atmung von Froschembryonen; wir wollten damals in erster Linie die Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches von dem Fortschreiten der Entwicklung ermitteln, und erfahren, welche Bestandteile des Eies an diesen Umsetzungen teilnehmen. Das wichtigste Ergebnis der Versuche, welche an R. esculenta, Bufo variabilis und vulgaris ausgeführt worden sind, war die Feststellung, daß der Zuwachs in der Atmungsintensität mit der Entwicklung nicht gleichmäßig ist: in einzelnen Entwicklungsphasen verbrauchten die Eier Sauerstoff mit gleichmäßiger Geschwindigkeit, welche recht plötzlich in eine neue, größere übergeht: besonders charakteristisch erschien der Knick in der Sauerstoffverbrauchskurve, welche der Anlage der Medullarfalten entspricht. Es wurde damals auch festgestellt, daß der Fettgehalt von Eiern und von — in gleicher Zahl — ausgeschlüpften Larven desselben Weibchens gleich war, daß folglich der Entwicklung des Froscheies keine Fettverbrennung entspricht.

Im Jahre 1915 arbeiteten Bialaszewicz und Błędowski in Warschau über den gleichen Gegenstand; ihre Untersuchungen behandelten viele Fragen der Entwicklungsphysiologie der Froscheier und führten in

---

[1]) Der Wissenschaftlichen Gesellschaft in Warschau vorgelegt im Juni 1919.

[2]) Professor Emil Godlewski jun., der im Jahre 1902 als erster die Atmung von Froscheiern quantitativ verfolgte, unterstützte uns mit allen Mitteln, und vertrat selbst oft den Experimentator, wenn derselbe dienstlich von seinen Versuchen ferngehalten wurde.

einigen Punkten zu anderen Schlüssen als unsere Versuche: die Atmungsintensität wuchs gleichmäßig mit der Entwicklung, der respiratorische Quotient deutete auf Fettverbrennung.

Im Jahre 1919 haben wir unsere Versuche wieder aufgenommen; die Ergebnisse teilen wir mit.

Es wäre überflüssig, über die Bedeutung der Oxydationsprozesse für das Leben des Embryos ausführlich zu behandeln; diese Frage ist von den Forschern, die sich mit diesem Gegenstand beschäftigt hatten — J. Loeb, Godlewski, Warburg, Białaszewicz sowie Roux, Samassa, Schultze —, mit aller Klarheit behandelt worden. Wir möchten nur betonen, daß die Oxydationsvorgänge im Embryo anders gedeutet werden müssen als diejenigen, welche im erwachsenen Organismus stattfinden. Dem Erwachsenen ist der oxydative Stoffwechsel im wesentlichen Verbrennung: der verbrauchte Sauerstoff dient zur Verbrennung und erscheint als CO_2 und H_2O wieder. Im Embryo überwiegt der assimilatorische Stoffwechsel, die Umwandlung von Reservestoffen in Bestandteile der lebenden Substanz. Die Verbrennungen treten hier quantitativ gegen diejenigen chemischen Vorgänge zurück, welche im assimilatorischen Teile des Stoffwechsels des erwachsenen Organismus nicht faßbar sind.

Der Sauerstoffverbrauch wurde in mehrtägigen Versuchen bestimmt; die Eier entwickelten sich in Warburgschen Respirationsgläschen mit seitlichen Kammern, die Kalilauge enthielten; der Sauerstoffverbrauch wurde mittels Barcrofftmanometer abgelesen. Die Respirationsgläser hatten ein Volumen von je 18 ccm; die Eier lagen (in Gallerte, manchmal beschnitten, manchmal auch von Gallerte befreit) am Boden der Gläschen. Im gleichen, genau regulierten Wasserbade — bei Unterzimmertemperatur — wurden Behälter mit Eiern der gleichen Provenienz gehalten, aus welchen bei Ablesungen der Respirationsapparate Proben zur Kontrolle des Entwicklungszustandes entnommen wurden. Die Ablesungen der Druckabnahme (in Millimetern) an den — mit Brodiescher Lösung gefüllten — Manometern wurden nach der Formel

$$\text{Verbrauchtes Sauerstoffvolumen} = \frac{\text{Gasvolumen des Respirationsglases}^{1)} \times \text{Druckabnahme}}{10\,000}$$

umgerechnet und auf 0° und 760 mm reduziert.

Die Druckänderungen, welche durch physische Sättigung des Wassers, der Gallerte und der Eier mit Sauerstoff oder Luft

[1]) Unter Berücksichtigung des Gasvolumens in den Manometern.

bedingt werden, finden in den ersten Stunden der Versuche statt. Die kurze Dauer dieser Störungen im Vergleich mit der langen Dauer des Versuches stellt den gewichtigsten Vorteil langdauernder Versuche dar. In späteren Zeiten des Versuches besteht bereits ein Sättigungsgleichgewicht, welches nur durch den Sauerstoffverbrauch der atmenden Embryonen gestört wird; der Sauerstoffverbrauch kann dann als innere Atmung der Eier angesehen werden.

Die Versuche wurden bei 15° geführt, wenn der Stoffwechsel längerer Perioden gemessen werden sollte, bei 11°, wenn wir den Atmungsverlauf in einzelnen Entwicklungsabschnitten kennen lernen wollten. Diese Temperaturen liegen jedenfalls denjenigen sehr nahe, bei welchen sich die Eier der im Frühling laichenden Batrachier entwickeln.

Die Temporarieneier waren künstlich befruchtet[1]); sie wurden nach dem Erscheinen der ersten Furche in den Versuch genommen. Die Eier von Bufo und Esculenta entstammten der normalen Kopulation.

Bei langdauernden Versuchen mußte als Fehlerquelle der Gaswechsel von Mikroorganismen in Frage kommen, für welche die Gallerte als Nährboden dienen konnte. Wir haben indessen in Austrichpräparaten von Gallerten, in welchen sich Eier 70 Stunden lang entwickelt hatten, keine Bakterien nach Färbung finden können.

Es war ferner mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Stoffwechselprodukte, die ins Umgebungswasser der Embryonen hinausdiffundieren, auf den Stoffwechsel hemmend rückwirken könnten. Indessen haben wir ein Kriterium im normalen Verlauf der Entwicklungsvorgänge, und zwar in der Übereinstimmung der Embryonen in dem Respirationsgläschen mit den Embryonen im größeren Kontrollgefäß. Aus dem Verlauf der Respirationsintensität kann man nicht auf normalen Verlauf der Entwicklungsprozesse schließen; so kann nach O. Warburg die Entwicklung der Seeigeleier ohne bedeutende Herabsetzung der Respirationsvorgänge aufgehalten werden. Dagegen kann der normale Verlauf der Entwicklung als Kriterium des gleichfalls nor-

---

[1]) Die Eier wurden in Porzellankuvetten mittels weicher Fischbeinsonden schnell trocken ausgestrichen (einschichtig), darauf aus einer Pipette mit konzentriertem Sperma befeuchtet; erst dann wurde Wasser dazugegeben.

malen Verlaufes der chemischen Lebensvorgänge angesehen werden: zumindest liegt nichts vor, was gegen diese Auffassung spräche.

Es mußten solche Versuchsbedingungen eingehalten werden, unter welchen (bei gegebener Temperatur) die Eier für ihre maximale Entwicklungsintensität genügend Sauerstoff durch Diffusion erhalten; wenn der Sauerstoffzutritt der begrenzende Faktor für Stoffwechsel und Entwicklung wird, dann treten völlig unübersichtliche Verhältnisse ein. Wir wählten folglich genügend niedrige Temperaturen und genügend hohen Sauerstoffpartialdruck, und überzeugten uns, daß eine Erhöhung des O_2-Partialdrucks keine Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei gegebener Temperatur bedingt. Wenn wir die Froscheier bei 15° sich entwickeln ließen, dann waren die Embryonen nach 70 Stunden (s. Tabelle II) in Sauerstoff ein wenig weiter fortgeschritten als in Luft, in der Versuchsreihe III (s. Tabelle IV) sind diese Unterschiede kaum merkbar. Bei 11° verschwanden sie ganz, denn die Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs ist bei dieser Temperatur gegenüber 15° so gut wie unverändert, dagegen die Entwicklungsgeschwindigkeit stark herabgesetzt. Die Gallerthülle, die im Verhältnis zum Ei so dick ist, könnte vielleicht den Sauerstoffzutritt zu den atmenden Schichten des Eies einschränken: das Gas kann durch das dünne Gel wohl mit der gleichen Geschwindigkeit durchtreten wie durch reines Wasser, aber Konvektionsströme sind ausgeschlossen. Wir haben in Parallelversuchen, in welchen sich die einen Eier in ihren Gallerthüllen entwickelten, die anderen ohne, und zwar sowohl in Luft wie in reinem Sauerstoff, keine merklichen Unterschiede in der Entwicklung feststellen können: die Geschwindigkeit des O_2-Durchtritts durch die Hüllen einzelner Eier muß also bei 11° oder 15° im Vergleich mit der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs groß sein. Übrigens könnte die Anwesenheit der Gallerte als Hindernis des Sauerstoffzutritts die Kurven des Verbrauchs nur verschieben, nicht deformieren[1].

[1]) Unter den Bedingungen der natürlichen Entwicklung des Froscheies — also in Tümpeln und Bächen — sieht man in jedem Laichklumpen Embryonen von recht verschieden fortgeschrittener Entwicklung. Hier spielt wahrscheinlich der Sauerstoffzutritt für die tieferen Schichten der Klumpen doch die Rolle eines die Entwicklung begrenzenden Faktors.

Die Embryonen, welche zur Kontrolle der Entwicklungsstadien dem großen Behälter entnommen waren, wurden in Formalin gehärtet und gezeichnet; in manchen Versuchen wurden die Entwicklungsstufen an Hand der bekannten Zieglerschen Modellreihe mit der Nummer des entsprechenden Modells bezeichnet. In dieser Weise sind auch die Entwicklungsstufen auf den Kurvenbildern bezeichnet.

Der Einfluß der Befruchtung auf den Gaswechsel ist von Warburg an Seeigeleiern, von Białaszewicz und Błędowski an Eiern von Rana temporaria untersucht worden. In den Versuchen der letzteren Forscher stieg die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in 6,2 Stunden nach der Befruchtung um 76%.

Wir haben gefunden, daß befruchtete Eier von Bufo vulgaris (40 Eier, t = 14°) in den ersten 14 Stunden und in Luft 0,34 cmm O_2 für das Ei und die Stunde verbrauchen; unbefruchtete Eier verbrauchen nur je 0,09 cmm. In reinem Sauerstoff ist die Differenz zwischen dem Verbrauch befruchteter und unbefruchteter Eier ebenso groß, obwohl die absoluten Werte infolge Sauerstoffverbrauchs für die Sättigung der Eier mit Sauerstoff viel höher sind.

Wir legen kein großes Gewicht auf diese Messungen; da die unbefruchteten Froscheier in wenigen Stunden nach dem Verlassen der Eileiter die Befruchtbarkeit verlieren, so müssen sie als absterbende Organismen betrachtet werden, deren Sauerstoffverbrauch keine klare physiologische Bedeutung hat. Vielleicht handelt es sich z. B. um Oxydation ungesättigter Lipoide, also um einen Vorgang, der in normal sich entwickelnden Froscheiern nicht stattfindet. Wir halten den hohen Partialdruck des Kohlendioxyds und den niedrigen des Sauerstoffs, wie sie von Białaszewski und Błędowski in den Eiern im Eileiter gefunden haben, für einen wichtigen physiologischen Faktor: indem durch diese Gasdrucke die Eier in einem Zustand von Asphyxie und Narkose erhalten werden, bleiben sie in den langen Zeiträumen konserviert, in welchen das Ei vor der Befruchtung von dem Stoffaustausch mit dem mütterlichen Organismus abgeschnitten ist.

Wir haben den Verlauf des Sauerstoffverbrauchs in Embryonen von 32 Blastomeren an bis zu ausgeschlüpften Kaul-

quappen bestimmt. Wenn die Versuche an Eiern im Stadium von 2 Blastomeren begonnen werden, dann sind die ersten Meßperioden durch die Ausgleichung der Drucke getrübt und können

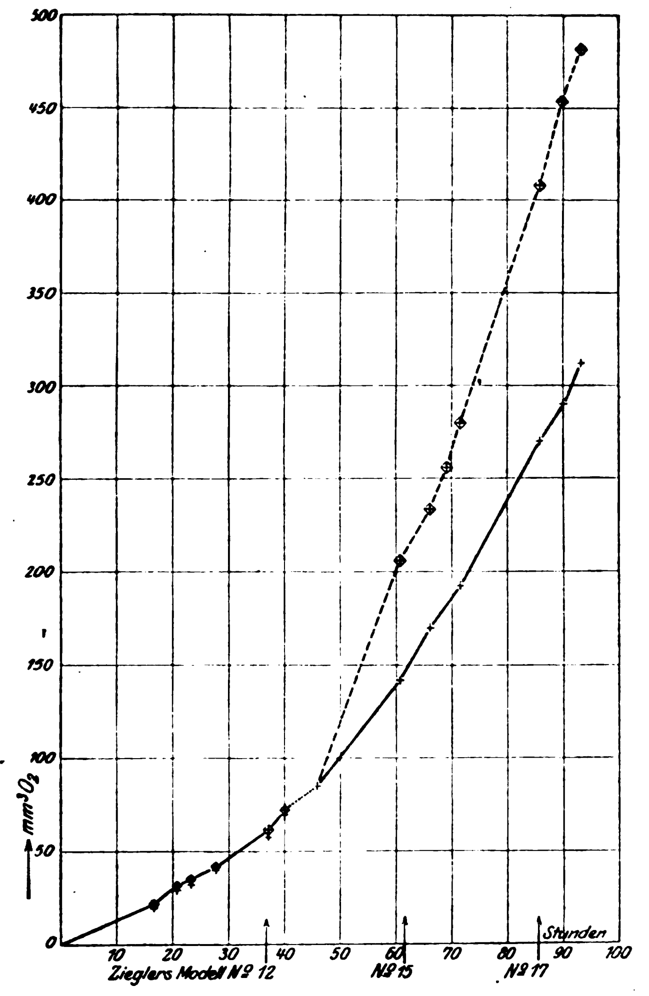


Abb. 1. Reihe I. O_2-Verbrauch für 20 Embryonen von Versuchsbeginn an.

nicht vollwertig in Betracht gezogen werden. Die Experimente der Reihe I und II (Tabelle I und II, Abb. 1 und 2) geben ein allgemeines Bild des Atmungsverlaufs; die Frühstadien bis zur Anlage der Medullarfalten sind ausführlich in den Versuchen der Reihe IX (Tabelle V, Abb. 5 und 6) gemessen, welche bei niederer

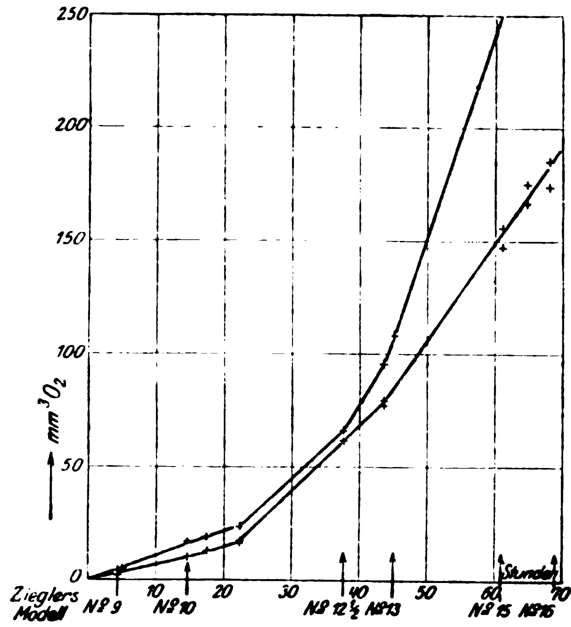


Abb. 2. Reihe II. Rana temporaria 20 Embryonen O_2-Verbrauch in cmm.

Temperatur durchgeführt wurden. Die Reihe III (Tabelle IV, Abb. 4) enthält den Verlauf der mittleren Periode, den Übergang von der Gastrula zur Neurula; die späteren Abschnitte, bis zum Ausschlüpfen, sind in den Reihen XII (Tabelle VI, Abb. 8), Reihe XVIII (Tabelle VII, Abb. 7), Reihe XIX (Tabelle VI, Abb. 8) behandelt, die sich auf Esculenteneier beziehen. Aus dem Verlauf des Sauerstoffverbrauchs in den Experimenten der Reihe I und II (Tabelle I, II, III, Abb. 1, 2, 3) geht hervor, daß der Zuwachs der Atmungsintensität nicht kontinuierlich ist. Zu Beginn

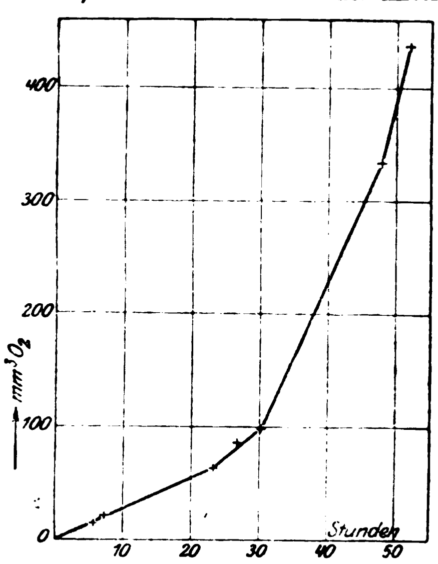


Abb. 3. Reihe II. Experiment V. Rana temporaria O_2-Verbrauch in cmm für 20 Embryonen von Versuchsbeginn an.

der Entwicklung ist der Sauerstoffverbrauch fast gleichmäßig und nimmt nur unbedeutend in den Stufen späterer Morula und Blastula zu. Die Vermehrung der Zellen ist mit einer unbedeutenden Steigerung des Sauerstoffverbrauchs verbunden; wir ziehen keine Schlüsse über den übrigen Stoffwechsel. Erst die Formung einer Gastrula bedingt einen bedeutenderen Zuwachs der Oxydationsintensität: während der Gastrulierung sehen wir einen kontinuierlichen Zuwachs, der aber klein ist im Vergleich mit dem anfänglichen Knicke. Eine gewaltige Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs tritt erst mit der Anlage der Neuromedullarfalten ein: dieser Augenblick tritt in dem Experiment der Reihe IX (Tabelle V, Abb. 5, 6) deutlich hervor. In allen unseren Versuchen ist dieser Punkt sehr deutlich, die morphogenetischen Prozesse äußern sich hier überaus deutlich in der Stoffwechselintensität. Wir möchten sagen, daß die Teilung der Zellen und die Differenzierung in potentiell verschiedene Zellen bei nahezu gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch vor sich geht, daß dagegen die Differenzierung der Keimblätter, also die Bildung chemisch und strukturell differenter Zellen, eine Steigerung des Stoffwechsels bedingt, und im Dienste des erhöhten Stoffwechsels steht der erhöhte Sauerstoffverbrauch.

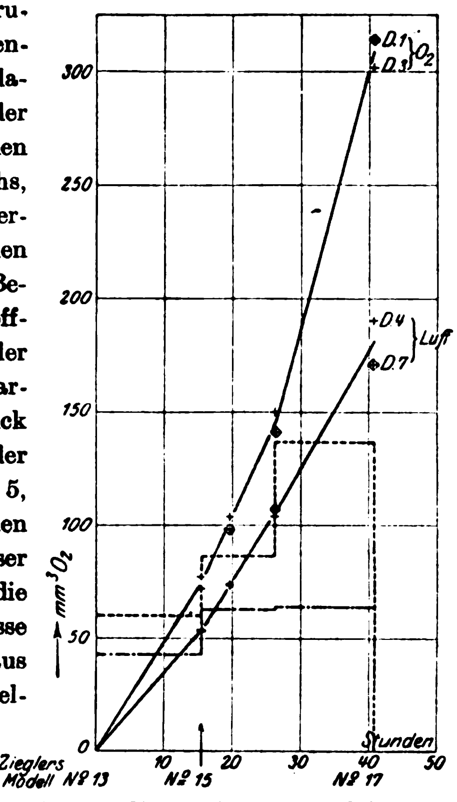


Abb. 4. Reihe III. Rana temporaria O_2-Verbrauch für 20 Eier seit Versuchsbeginn. O_2-Verbrauch pro Stunde in Sauerstoff. O_2-Verbrauch pro Stunde in Luft.

Von Beginn der Neurula bis zur Bildung der äußeren Kiemen verändert sich die Atmungsintensität nur wenig. Die Kiemenbildung stellt den dritten Wendepunkt der Sauerstoff-

verbrauchskurve dar: dann folgt eine Zeit sehr gleichmäßiger Atmung.

Es muß erwogen werden, ob die Knickpunkte der Sauerstoffverbrauchskurve nicht durch äußere Faktoren bedingt werden, vor allem durch den Sauerstoffzutritt zum Ei. So wäre daran zu denken, daß bei der Neurulabildung die Abweichung von der Kugelgestalt des Eies und der vergrößerte Quotient der Oberfläche durch die Masse einen ausgiebigeren Sauerstoffzutritt und vielleicht dadurch erhöhten Verbrauch gestattet. Die Gesamtheit unserer Versuche spricht gegen eine solche Auffassung. Gastrulae

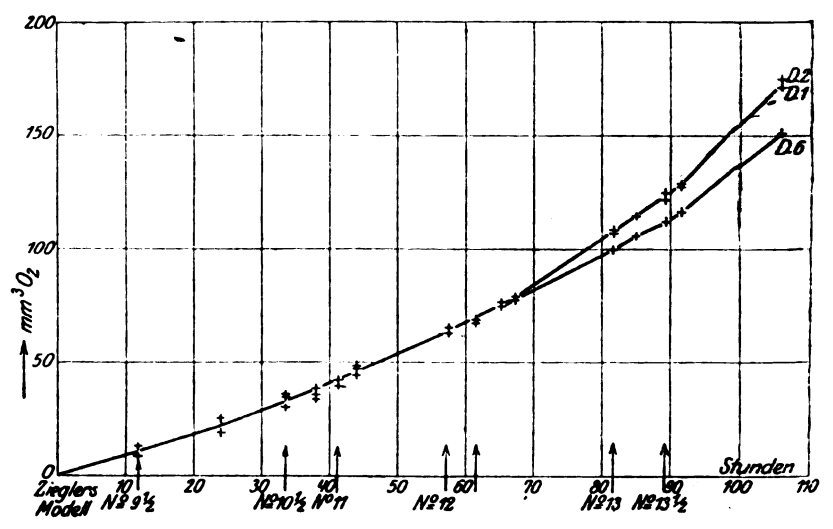


Abb. 5. Reihe IX. Rana temporaria O_2-Verbrauch in cmm für 20 Eier seit Versuchsbeginn.

atmen gleich stark in Luft und reinem Sauerstoff (Serie I, II, III, Tabellen I—IV, Abb. 1—4), obwohl die verfügbare Sauerstoffmenge in diesen Fällen sehr verschieden ist. Eine Gastrula verbraucht bei 15° soviel O_2 (0,147 cmm pro Stunde), wie eine Neurula bei 11° (0,153 cmm), wie verschieden die Oberflächengestaltung auch ist. Nicht der Sauerstoffzutritt, sondern der innere Verbrauch ist für die Sauerstoffaufnahme maßgebend.

Wir möchten den Verlauf des Sauerstoffverbrauches in Abhängigkeit von der morphologischen Entwicklung folgendermaßen deuten. Die Entwicklung der Gewebe und die Differenzierung ist mit einer Umwandlung und Differenzierung der Eiweißkörper verbunden. Die Vorratseiweißkörper des Eies bestehen aus wenigen

Eiweißarten, und diese müssen jene Aminosäuren in genügender Menge enthalten, welche für die Larve notwendig sind, aber nicht von ihr hergestellt werden können. Es ist dagegen nicht wahrscheinlich, daß die endogenen Aminosäuren ebenfalls in genau denjenigen Verhältnissen im Eiweiß des Eies enthalten sind, in welchem sie in den Bestand der Larve eingehen werden. Bei dem Umbau der Eiweißstoffe erfolgt wahrscheinlich nicht nur eine Umstellung der Aminosäuren, sondern auch ein Umbau der Aminosäuren. Dieser Umbau ist natürlich mit einer Abspaltung von Fragmenten der Aminosäurenmoleküle verbunden. Außer

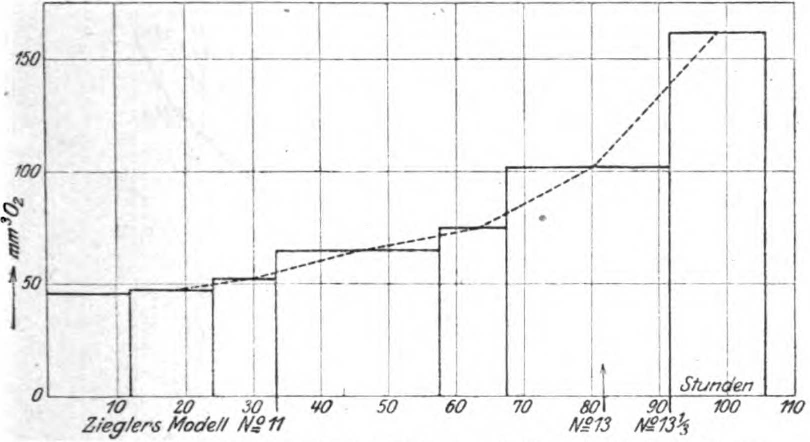


Abb. 6. Reihe IX. O_2-Verbrauch für 1000 Eier pro Stunde. Durchschnittswert aus Experiment 1 und 2.

gegenseitiger Umwandlung der Aminosäuren muß auch die Bildung von Basen, Kohlenhydraten u. a. aus Eiweiß erfolgen. Solche Prozesse sind wahrscheinlich mit Oxydationen verbunden; die Oxydationen können entweder mit der Einführung von Hydroxylen in die Körper verbunden sein, welche zu Bestandteilen des Organismus werden: für eine solche Verwendung des Sauerstoffs spricht der niedrige respiratorische Quotient, den Białaszewicz und Błędowski beobachtet haben, und der nicht einer Fettverbrennung entsprechen kann, wie er früher gedeutet worden ist. Oder aber die Oxydationen dienen zur Umwandlung der abgespalteten organischen Fragmente der Eiweißmoleküle in solche Verbrennungsprodukte, welche für die Ausscheidung besonders geeignet sind. Eine solche Auffassung der Oxydationsprozesse erscheint um so wahrscheinlicher, als die Reservefette des Eies

während der Entwicklung weder quantitativ noch qualitativ eine Umwandlung erfahren: wir haben uns davon überzeugt, indem wir qualitativ und quantitativ den Fettgehalt unbefruchteter Eier und ausgeschlüpfter Larven bestimmten.

Wir stellen uns vor, daß die innere Arbeit, welche für die Umgruppierung der chemischen Bestandteile und den Aufbau der lebenden Struktur erforderlich ist, durch die Energie eben derjenigen Prozesse gedeckt wird, welche zur Synthese der einfachen chemischen Bestandteile führen. Die chemische Umformung und die Strukturbildung sind in den sich entwickelnden Embryonen

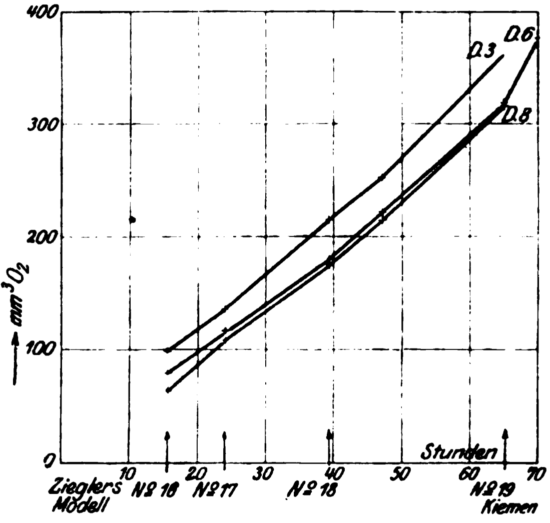


Abb. 7. Reihe XVIII. Rana esculenta 20 Embryonen O_2-Verbrauch in cmm.

chemisch und energetisch gekoppelt. Nach unserer Auffassung ist es nicht die Menge lebender Substanz im Embryo, nicht die Menge der Zellfermente und ihre besondere Verteilung, welche durch ihre Fähigkeit, Oxydationsprozesse zu beschleunigen, die Intensität der Verbrennungen in der Zelle bestimmen. Die Verbrennungen stellen einen Teil der Umsetzungen dar, aus welchen die lebende Substanz und ihre Bestandteile hervorgehen.

Wir stellen uns vor, daß in den ersten Entwicklungsphasen, also während der Furchung und Teilung der Eizelle in potentiell verschiedene Zellen, lediglich eine Verteilung bereits vorgebildeter chemischer Bestandteile unter den neugebildeten Zellen stattfindet; diese Bestandteile bestimmen das spätere chemische Geschehen

in der Zelle. In diesen Entwicklungsphasen hat doch Masing keinen Zuwachs des Nucleinphosphors im Ei feststellen können.

Erst wenn die Differenzierung der Gewebe (Keimblätter)

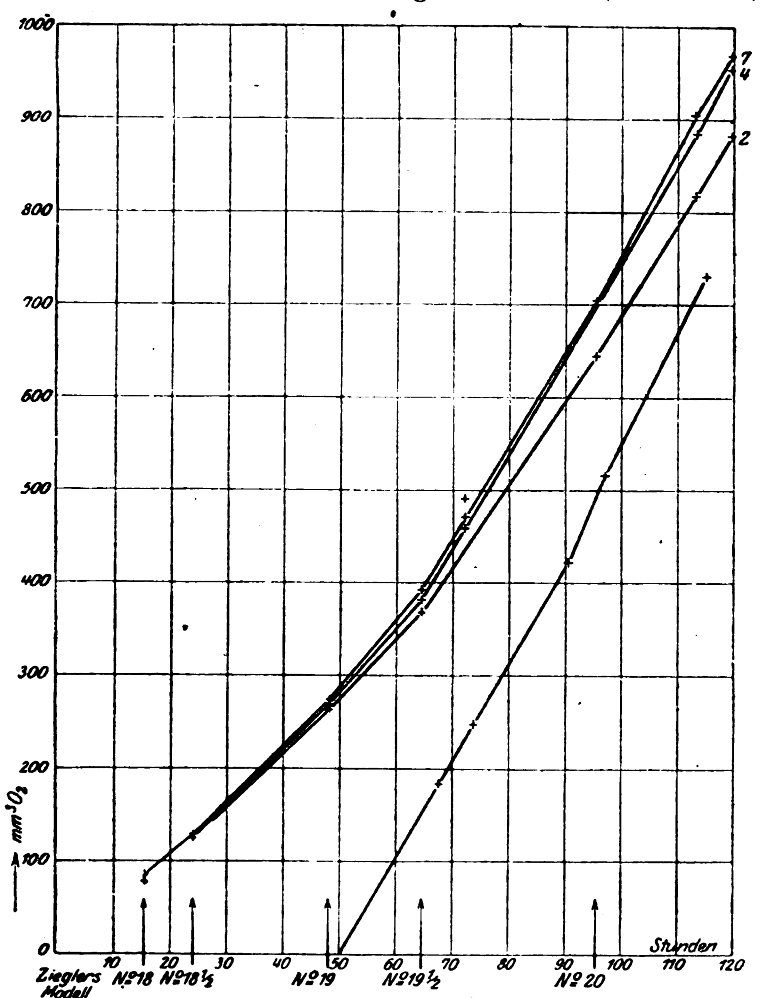


Abb. 8. Reihe XIX. Rana esculenta O_2-Verbrauch für 200 Embryonen. Reihe XII. Rana esculenta O_2-Verbrauch für 20 Embryonen. Durchschnittswert für 3 Experimente.

stattfindet, dann beginnt eine intensive chemische Arbeit, deren Ausdruck die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs ist.

Aus der Größe des Sauerstoffverbrauchs kann man schließen, daß die Entwicklungsprozesse an Verbrauch organischer Substanz sehr sparsam verlaufen. Eine ausgeschlüpfte Larve enthält (nach

Davenport) 44% Trockensubstanz: wenn man davon 12% als — während der Entwicklung nicht verbrennendes — Reservefett abzieht, so verbleiben etwa 33% des Lebendgewichts als Substanz, welche die Struktur der Larve resp. des Embryos bildet. In unseren Versuchen verbraucht ein Ei bis zum Ausschlüpfen der Larve 27 cmm, d. h. 0,039 mg Sauerstoff: diese Menge entspricht höchstens 0,054 mg CO_2 oder 0,0146 mg C. Wenn eine Kaulquappe von 2 mg Gewicht etwa 0,6 mg Eiweißsubstanzen enthält, darin etwa 0,3 mg C, dann beträgt die Kohlenstoffmenge, welche dem Ei während der Entwicklungsvorgänge verloren geht, höchstens 5% derjenigen Menge, mit welcher die Kaulquappe ausschlüpft. Die Eiweißstoffe des Eies müssen in ihrer Zusammensetzung für die Bedürfnisse der Gewebsbildung, die aus ihnen hervorgehen soll, ausgezeichnet vorbereitet sein, d. h. eine (für den Froschembryo) sehr hohe biologische Wertigkeit[1]) besitzen. In Parallelversuchen, in welchen die Eier einmal in Sauerstoff, das anderemal in Luft lebten, haben wir folgende Erscheinung beobachtet: nach der Sättigung des Wassers, der Gallerte und des Eies folgt eine Periode, in welcher der Sauerstoffverbrauch der Eier bei 150 und bei 760 mm O_2-Druck gleich ist. Diese Periode umfaßt die Blastula- und Gastrula-Stadien; darauf beginnt mit der Steigerung des Sauerstoffverbrauchs, die für den Beginn des Neurulastadiums bezeichnend ist, eine Divergenz der Sauerstoffverbrauchskurven in 20- und 100 proz. Sauerstoffatmosphäre. Die Embryonen verbrauchen von da an erheblich mehr Sauerstoff bei höherem Partialdruck dieses Gases. In der Versuchsreihe III (Tabelle IV, Abb. 4) verbrauchen junge Embryonen mit kaum angelegter Medullarrinne 0,586 cmm O_2 in der Stunde in reinem Sauerstoff, dagegen nur 0,257 cmm in 20 proz. Sauerstoff. Die Entwicklungsunterschiede waren am Ende dieses Versuches äußerst gering, kaum bemerkbar: die Larven aus der Sauerstoffatmosphäre waren ein wenig schlanker, kaum um wenige Stunden älter als diejenigen aus der Luftatmosphäre.

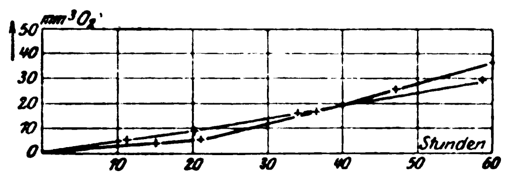


Abb. 8a. Buf. vulgaris. Von der Eiablage ab gemessen. Reihe XIV. Bufo variabilis 40 Embryonen; cmm O_2-Verbrauch von Versuchsbeginn an.

[1]) Im Sinne von Thomas, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1909.

Wir finden also, daß in unseren Versuchen die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks über 150 mm einen erheblichen Einfluß auf die Intensität der Oxydation, aber einen unerheblichen Einfluß auf die Entwicklungsgeschwindigkeit hat.

Es scheint nicht leicht, diese Erscheinung zu erklären. Vielleicht haben die intermediären Stoffwechselvorgänge im Ei einen breiten Spielraum für relative Anoxybiose; in geringerem Sauerstoffdruck an den Verbrauchsorten mögen vielleicht intermediäre Produkte in unvollständig oxydiertem Zustand ausgeschieden werden, bei höherem als CO_2 und H_2O.

Wir müssen im Anschluß daran einige bekannte Tatsachen erörtern, in welchen der Einfluß des Sauerstoffdrucks auf die Entwicklungsgeschwindigkeit hervortritt. In den bekannten Versuchen von Roux entwickeln sich Eier, die in der Tiefe eines Röhrchens liegen, nur in der Nähe einer Luftblase normal, die entfernteren bleiben zurück. Samassa fand, daß Eier in Wasserstoff, Stickstoff oder im Vakuum nur bis zur Blastula gelangen; E. Godlewski jun. hat beobachtet, daß in Luft befruchtete Eier im Wasserstoff nur zum Blastulastadium gelangen; wenn sie in Luft zurückgelangen, so entwickeln sie sich weiter. Godlewski faßt die Entwicklung in sauerstofffreier Atmosphäre als einen Vorgang auf, bei welchem kein Sauerstoff von außen zutritt, der in dem Ei und der Gallerte enthaltene Sauerstoff dagegen genau ausgenutzt wird. Godlewski beobachtete auch, daß Eier sich viel schneller entwickeln, wenn die Luft mit Sauerstoff durchperlt wird, als wenn sie sich in flachen Schalen an der Luft befinden.

Die Widersprüche zwischen diesen und unseren Versuchen möchten wir folgendermaßen erklären. Bei gleichen Sauerstoffdrucken und gleicher Oberfläche der Embryonen wird der Sauerstoffzutritt genügend oder ungenügend sein, je nach der

1. Temperatur, von welcher der Sauerstoffverbrauch abhängt,
2. der Verteilung der Embryonen in der sauerstoffhaltigen Flüssigkeit.

Der Einfluß der Verteilung macht sich z. B. in M. Henzes Versuchen über die Atmung der Seeigeleier geltend; auch in der Tatsache, daß Temporarieneier, die sich frei in Klumpen entwickeln, je nach der Lage in Klumpen weiter oder weniger weit fortgeschritten sind.

Bei höheren Sauerstoffdrucken erhalten die Eier auf dem

Wege der Diffusion reichlich Sauerstoff, und der Sauerstoffdruck wird nicht zum die Entwicklung begrenzenden Faktor. Wir haben beobachtet, daß Eier, die mit oder ohne Gallerte lose am Boden von Erlenmeyerkolben lagen, sich bei 14° mit gleicher Geschwindigkeit in Luft und in Sauerstoff entwickelten (Kontrollen der Reihen II und III).

Der Temperatureinfluß ist klar: bei 10° und 20° findet die Diffusion mit gleichbleibender Geschwindigkeit statt, der Sauerstoffverbrauch aber ist bei 20° 2,3fach größer als bei 10°. Der Sauerstoffzutritt, der bei 10° genügt, um maximale Entwicklungsgeschwindigkeit zu gestatten, kann bei 20° zum begrenzenden Faktor der Entwicklungsgeschwindigkeit werden.

Wir glauben, daß bei Berücksichtigung der beiden genannten Faktoren die scheinbare Divergenz der Ergebnisse von Godlewski und von uns erklärbar ist.

Um das Minimum des Sauerstoffdruckes kennen zu lernen, unter welchem Froscheier sich noch entwickeln können, haben wir 2 Versuchsreihen ausgeführt. Es wurden alle 24 Stunden die Entwicklungsstadien der Embryonen beobachtet, welche sich in Gasmischungen von verschiedenem Sauerstoffgehalt und bei atmosphärischem Druck befanden. In der Reihe V (Abb. 9), welche zur ersten Orientierung diente, wurden frühe Morulae in Wasserstoffgemischen mit 1-, 5-, 10- und 20proz. O_2 eingeführt; jede Flasche enthielt außerdem 15 ccm ausgekochtes Wasser. In reinem H_2 und in 1proz. Sauerstoff entwickelten sich die Eier bis zur Blastula, dann blieb die Entwicklung stehen, obwohl der Sauerstoff nicht erschöpft war. In höherprozentigen Sauerstoffgemischen entwickelten sich die Eier, die Geschwindigkeit des Entwicklungsvorganges war nach Maßgabe des Sauerstoffdruckes herabgesetzt.

In der Versuchsreihe VII (Abb. 10) werden die Eier direkt aus den Eileitern auf die Innenwand kleiner Stöpselgläser gebracht, sofort mit kleinster Menge konzentrierten Spermas befruchtet und nach 5′ (in einem Versuch absichtlich nach 20′) mit ausgekochtem, wasserstoffgesättigtem Wasser gefüllt: jetzt erst beginnt die Aufquellung der Gallerte. Die 6 Gläser werden nun unter Wasser umgedreht und mit je 29 ccm Wasserstoff, Sauerstoff und Gemischen gefüllt, welche 1-, 4-, 10- und 20proz. O_2 enthielten. Die Temperatur beträgt in diesen Versuchen 10 bis

17° und ist für alle Gläschen, die in einem gemeinsamen Wasserbad stehen, genau gleich.

Die Ergebnisse sind in Abb. 10 zusammengestellt: im Wasserstoff sowie in ausgekochtem Wasser entwickelt sich das Ei bis zur Blastula, im 1 proz. O_2 gelangt es bis zur Neurula. In anderen Gemischen sehen wir sehr regelmäßige Verspätung der Entwicklung, je nach dem Sauerstoffdruck. Auf Grund dieser Versuche sprechen wir die Überzeugung aus, daß die ersten Stadien der Furchung einen echten anaeroben Vorgang darstellen. Die Sauerstoffmengen, welche das Ei aufnehmen konnte, bevor es in die sauerstofffreie Atmosphäre kam, können nur minimal gewesen sein, die Gallerte quoll bereits in sauerstofffreiem Wasser. Das Ei befand sich lange vor Beginn der Furchung unter äußerst geringem Sauerstoffdrucke, jedenfalls unter einem geringeren als derjenige, in welchem eine Gastrula nicht vorwärts kommt. Übrigens entwickelten sich die Eier, welche 20′ lang an der Luft waren, nicht weiter als diejenigen, welchen nach 5′ Sauerstoff entzogen worden ist.

In den Versuchen der Reihe VII (Abb. 10) sowie in einem der Respirationsversuche (Reihe II, Abb. 11) sind die Eier in der Luft weiter zurückgeblieben als in Sauerstoff. In beiden Versuchen befinden sich die Eier in geringen Wassermengen, eigentlich nur in stark gequollener Gallerte. Die Verspätung war erheblich geringer, als der Verspätung im Sauerstoffverbrauch entsprach. Vielleicht hemmen die weniger oxydierten intermediären Produkte die Entwicklung stärker als die Endprodukte der Verbrennung, und dieser Faktor tritt in Erscheinung, wenn sich das Ei in geringen Wassermengen entwickelt, nicht aber in großen.

Zwei Punkte werden in der Entwicklung des Froscheies durch den Verlauf sowohl der Oxydationsvorgänge, als der morphogenetischen Vorgänge hervorgehoben. Der erste liegt an der Grenze zwischen der Blastula und der Gastrula; in diesem Punkte hört die Fähigkeit anaerober Entwicklung auf und es tritt die erste Steigerung des Sauerstoffverbrauchs ein. Der zweite Punkt liegt am Beginn der Neurula, er fällt also mit der Veränderung der äußeren Form zusammen; es beginnt in diesem Punkt eine Periode erhöhten Sauerstoffverbrauchs, der besonders deutlich in einer reinen Sauerstoffatmosphäre in Erscheinung tritt. Wir ver-

suchten es, diese Punkte noch in anderer Weise zu charakterisieren: wir erwarteten, daß die Entwicklungsvorgänge eine steigende Empfindlichkeit gegen Narkotica aufweisen, und prüften, ob in diesen Punkten eine plötzliche Steigerung der Empfindlichkeit auftritt. Es war anzunehmen, daß die Embryonen um so empfindlicher gegen bestimmte Konzentrationen von Narkoticis sein werden, je weiter ihre Entwicklung fortgeschritten sein wird: sowohl die besondere Empfindlichkeit des Nervengewebes, als überhaupt die Zunahme der Empfindlichkeit mit Zunahme der Struktur ließ dieses erwarten (Warburg).

Wir beobachteten den Verlauf der Entwicklung in Lösungen von Äthylurethan und von Chloralhydrat von steigender Konzentration und bestimmten die Konzentration, welche die Entwicklung in bestimmter Phase befindlicher Embryonen vollständig hemmte. Es wurden Urethanlösungen von 0,001—0,1 n geprüft, die Gefäße standen in einem gemeinsamen Wasserbad bei freiem Luftzutritt; die Embryonen wurden alle 24 Stunden gezeichnet.

Die Abb. 11—16 enthalten die Resultate in graphischer Darstellung. In Urethanlösungen von $^1/_{50}$ n an und in Chloralhydratlösungen von $^1/_{500}$ n an zeigen alle Entwicklungsstufen regelmäßig abgestufte Verspätung der Entwicklung. Es interessieren uns aber vor allem Grenzkonzentrationen, welche auf bestimmte Entwicklungsstufen tödlich wirken.

In 0,1 n-Urethanlösungen geht das frisch befruchtete Ei unter Anlage von unregelmäßigen Furchen zugrunde (Abb. 11); die Blastula entwickelt sich nicht (Abb. 12); die Gastrula legt Medullarfalten an und dehnt sich ein wenig aus, dann aber geht sie zugrunde, ohne sich geschlossen zu haben Eine Neurula aber entwickelt sich in 0,1 n-Urethanlösung 10 Tage lang, wenn auch sehr langsam.

In $^1/_{20}$ n-Urethanlösungen entwickelt sich das Ei zur frühen Blastula und geht dann zugrunde (Abb. 11); die Blastula entwickelt sich nicht (Abb. 12); die Gastrula entwickelt sich zur Neurula (Abb. 13), und die Neurula entwickelt sich zu anormalen säbelförmig gekrümmten, aber lebhaften, mit Kiemen versehenen, ausgeschlüpften Larven.

Die Empfindlichkeit gegen Zellnarkotica hat also zu Beginn der Gastrulabildung ein Maximum: in Lösungen, in welchen die Entwicklung das Blastulastadium nicht überschreiten kann, ent-

wickeln sich bereits fertige Gastrulae zu Neurulen, und Neurulae zu lebhaften Kaulquappen.

Diese Versuche weisen wieder auf den Beginn der Differenzierung der Keimblätter hin als einen physiologisch-chemisch besonders charakterisierten Punkt. Die geringere Empfindlichkeit späterer Entwicklungsstadien des Froscheies scheint eine neue und unerwartete Erscheinung zu sein. Sie besteht wohl kaum in einer veränderten Permeabilität der Körperhülle für die angewandten Narkotica, denn es wären dann auch höhere Konzentrationen unwirksam.

Wir möchten die beschriebenen Tatsachen in folgender theoretischer Fassung auszudrücken versuchen:

Die Bedingungen der Furchung sind — abgesehen von dem Befruchtungsimpuls und der Anwesenheit eines wässerigen Mediums — im Ei vollständig gegeben: die Furchung kann ohne oxydativen Stoffwechsel vor sich gehen. Während der Blastulaentwicklung bereiten sich die Bedingungen für eine neue Phase des Stoffwechsels, für den oxydativen Stoffwechsel, vor, und von diesem hängen die Vorgänge der Gewebsbildung ab. Sauerstoffmangel hält diese Vorgänge auf. Dieser Vorgang, welcher die Überleitung auf den oxydativen Eigenstoffwechsel des neuen Individuums darstellt, scheint gegen Narkotica besonders empfindlich zu sein; wenn das oxydierende und die Oxydationen ausnutzende System der lebenden Substanz einmal angelegt ist, dann ist die Empfindlichkeit gegen Narkotica geringer.

Um festzustellen, ob die Fette während der Entwicklungsvorgänge im Froschei eine Umwandlung erfahren, haben wir in abgezählten Mengen von Eiern eines Weibchens den Fettgehalt und die Art der Fette bestimmt; der Rest der Eier wurde befruchtet, und nachdem sie sich zu gerade ausgeschlüpften Kaulquappen (Zieglers Modell Nr. 20) entwickelt hatten, wurde in einer abgezählten Menge von Kaulquappen wieder eine Fettbestimmung vorgenommen. Wir haben uns der Bestimmungsmethode nach Kumagawa-Suto sowie nach Liebermann bedient, folglich nicht nur die Neutralfette, sondern auch freie Fettsäuren und solche, die sich in hydrolysierbaren Lipoiden befinden, bestimmt[1]).

[1]) Beim Vergleich der Eier und der Kaulquappen bestimmt man die Eier samt Gallerte, die Kaulquappen ohne Gallerte. Die Gallerte enthält indessen — nach Giacosa — nur Mucin, es kann folglich der Fettgehalt vernachlässigt werden.

Die Art der Fettsäuren wurde durch Bestimmung der Acidität und der Jodzahl bestimmt. Außerdem haben wir das Cholesterin nach Authenrieth-Funk bestimmt und die Menge des chloroformlöslichen Phosphors.

1. R. esculenta, Juni 1915, Fettbestimmung nach Kumagawa. 3970 Eier enthalten 1,1232 g Fettsäuren. 1 Ei wiegt 2,6 mg und enthält 0,283 mg Fettsäure. 565 Larven (Zieglers Nr. 20) enthalten 0,1597 g Fettsäuren; eine Kaulquappe enthält 0,2835 mg Fettsäure.

2. R. temporaria, April 1919 (Methode Liebermann). 372 Eier enthalten 0,1542 g Fettsäure; 1 Ei 0,336 mg. 580 Larven 0,1940 g Fettsäure; 1 Kaulquappe 0,335 mg. Jodzahl, Eifett: 0,0626 g, verbrauchen: 66,6 mg. Jodzahl: 106,4. Kaulquappenfett: 0,0979 g verbraucht 101 mg J. Jodzahl: 104.

3. R. temporaria, April 1919 (Methode Liebermann). 774 Eier enthalten 0,2490 g Fettsäuren; 1 Ei 0,322 mg. 463 Kaulquappen enthalten 0,1590 g Fettsäuren; 1 davon 0,343 mg. Acidität: 0,1245 g Fettsäure aus Eiern verbraucht 3,43 ccm $^1/_{10}$-NaOH. Molekulargewicht: 362. 0,0795 g Kaulquappenfettsäure verbrauchen 2,21 ccm O $^1/$n-NaOH. Molekulargewicht: 364.

Ad Vers. 2. Cholesteringehalt: Eier 8,5 mg Cholesterin in 62,6 mg Fettsäuren, also 13,6%. Kaulquappen 16,4 mg Cholesterin in 97 mg Fettsäuren; also 16,7%.

Die Fettsäuren der Froscheier und der Kaulquappe stellen bei Zimmertemperatur eine schön gelbe, krystallinische Masse dar. Nach Berücksichtigung des Cholesteringehalts beträgt das Molekulargewicht der Fettsäuren etwa 308, ist also scheinbar größer, als dem Gehalt von 18 Kohlenstoffatomen entspräche; doch kann diese Schätzung unrichtig sein, wenn etwa außer Cholesterin andere hohe Alkohole im Eifett enthalten sind. Die hohe Jodzahl (sie beträgt für Ölsäure 89) beweist, daß unter den Fettsäuren der Eier und Kaulquappen mehrfach ungesättigte enthalten sind.

Aus diesen Bestimmungen geht klar hervor, daß die Fette an dem Entwicklungsstoffwechsel der Froscheier nicht teilnehmen. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch sowohl mit den Behauptungen derjenigen Forscher, welche einen Fettverbrauch während der Entwicklung gefunden haben, wie derjenigen, welche Fettzunahme beobachteten.

Zur Bestimmung des lipoiden Phosphors wurden die Eier in Alkohol und Quarzsand zerrieben; in der gleichen Weise wurden abgezählte Kaulquappen behandelt. Der Alkoholextrakt wurde abfiltriert und abgedampft, der Rückstand und das Unlösliche wurde mit Chloroform heiß ausgezogen. Der Verdampfungsrückstand des Chloroformauszugs wurde mit Soda und Salpeter verbrannt, der Phosphor nach Lorentz-Pregl bestimmt.

1. Versuch 27: Befruchtung am 5. IV. 896 Eier geben 0,0152 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 4,2 mg P. 1 Ei enthält 0,0045 mg P. 448 Kaulquappen geben 0,1122 g Ammonphosphormolybdat, entsprechend 3,56 mg P. 1 Kaulquappe enthält 0,00356 mg P.

2. Versuch 29. 1087 Eier geben 0,0240 g $Mg_2P_2O_7$, entsprechend 6,68 mg P; 1 Ei 0,00614 mg P. 500 Kaulquappen 0,1593 g Phosphormolybdat, entsprechend 4,62 mg P; 1 Ei 0,00425 mg P.

Die Eier aus dem Versuch 27 wiegen je 6,4 mg, aus dem Versuch 29 9,5 mg. Daraus erklären sich die Unterschiede im P-Gehalt. Die Kaulquappen enthalten weniger Lipoidphosphor als die Eier, aus denen sie entstanden sind. Die Abnahme des Lipoidphosphors stimmt mit der Hypothese von J. Loeb überein, nach der „Lecithinphosphor" während der Entwicklung des Eies in Nucleinphosphor umgewandelt wird.

Versuchsprotokolle.

Tabelle I.

Versuchsreihe I, R. temporaria (Abb. 1).

Zeit seit Versuchsbeginn	Temperatur	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn ab				Sauerstoffverbrauch und 1000 Eier pro Stunde				Histologische Kontrolle: Nummer des entsprechenden Ziegler-Modelles
		Versuch 1 20 Eier mit Gallerte	Versuch 6 20 Eier ohne Gallerte	Versuch 4 20 Eier mit Gallerte in O_2	Versuch 2 20 Eier in Gallerte	Versuch 1	Versuch 6	Versuch 4	Versuch 2	
	in °	cmm	cmm	cmm	cmm	cmm	cmm	cmm	cmm	
0	13	—	—	—	—	—	—	—	—	
13h 50′	13	13,7	16,2	—	15,0	48,5	59	—	54	
16h 50′	13,3	17,5	21,6	21,6	20,0					
20h 40′	14,3	29,3	29,9	31,9	29,9	102	73,6	100	93	
23h 10′	14,5	33,6	29,9	34,9	32,3					
27h 30′	12,8	41,9	42,0	41,1	40,0	125	125	95,3	91,3	
37h	12,8	68,2	66,2	61,2	57,5					
39h 50′	12,8	76,9	75,5	71,2	69,5	126	136	137	153	Gastrula Nr. 12
45h 50′	15	90,0*)	88,7	85,0	83,8					
61h	15,7	152,5	163,0	205,4	141,6	207	229	360	212	Neurula Nr. 15
66h 5′	14,3	174,9	187,7	232,4	169,8					
68h	15,3	—	—	255,7	174,1	—	—	448	259	
71h 30′	15,2	—	—	280,4	192,6					
85h 45′	15,0	—	—	408,7	269,7	—	—	—	—	
89h 45′	15,8	—	—	453,6	290,6	—	—	—	—	
92h 10′	13,3	—	—	477,5	309,1	—	—	644	292	Nr. 17
93h	14,8	—	—	482,0	312,0	—	—	—	—	

Befruchtet: 11h a. m.; Messung begonnen: 8h 30′ p. m. Versuch 1: 20 Eier in Gallerte, Luft; Versuch 6: 20 Eier ohne Gallerte, Luft; Versuch 4: 20 Eier mit Gallerte, Sauerstoff; Versuch 2: 20 Eier in Gallerte, Luft. Gasvolumen in Respirationsgläschen: 14,4 ccm.

*) Von 39h 50′ bis 45h 40′ unterbrochen, Geschwindigkeit nach durchschnittlichem Wert der zwei vorhergehenden Perioden interpoliert.

Tabelle II.

Versuchsreihe II (Abb. 2).

Zeit seit Versuchsbeginn	Temperatur in °	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn an			Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde			Embryologie oder Kontrolle:
		Versuch 1 cmm	Versuch 3 cmm	Versuch 7 cmm	Versuch 1 cmm	Versuch 3 cmm	Versuch 7 cmm	Nummer der Ziegler-Modelle.
4h 20′	13,8	1,72	1,35	4,53	19,85	15,60	52,80	64 Blastomeren
5h	13,8	2,83	1,60	5,30	41,5	25,35	55,0	—
14h 45′	14,2	10,20	6,54	15,78	—	—	—	Blastula $10^1/_2$
17h 35′	14,2	12,8	8,4	19,1	42,0	34,6	50,8	—
22h 15′	15,3	16,5	17,6	23,4	} 147,2	43,3	172,5	—
37h 40′	14,6	62,2	62,0	76,5	} 14,9	127,5	164,8	Gastrula 12
43h 30′	15	79,6	76,8	95,6				—
45h 5′	14,8	91,8	89,2	108,0	215,0	200	392,0	Gastrula 13
61h 5′	14,9	156,0	147,2	253,7	} 282,0	291,0	625,0	Neurula 15
64h 30′	15,1	175,2	167,0	293,7				—
68h 5′	15,2	185,3	173,8	316,3	—	—	—	Nr. 16

Beim II. R. temporaria. Befruchtung: 12h m 2.,5. IV. Messung begonnen 9h p. m., im Stadium von 64 Blastomeren.

Versuch 1: 20 Eier, Gallerte, Luft. Versuch 3: 20 Eier, ohne Gallerte, Luft. Versuch 7: 20 Eier, Gallerte, Sauerstoff. Gasvolumen: 13,2 ccm.

Nach Abschluß des Versuches: In einzelnen Gefäßen ganz gleichmäßig entwickelte Embryonen. Versuch 7: Embryonen entwickelt wie im großen Kontrollbassin. Versuch 1 und 3: Um 2 bis 3 Stunden verspätete Embryonen.

Tabelle III.

Versuchsreihe II. Versuch 5 (Abb. 3).

Zeit seit Versuchsbeginn	Temperatur in °	Sauerstoffverbrauch cmm	Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde cmm	Embryologische Kontrolle
5h 50′	15	15,3	} 138,0	
7h 25′	14,8	21,42		
23h 25′	14,9	64,4	—	
26h 50′	15,1	86,8	244,5	
30h 25′	15,2	98,6	—	
31h 10′	16,8	101,0	679	
47h 50′	14,8	234,5	} 1217	Nr. 18 { Geschwänzte Larven ohne Kiemen
52h 5′	14,7	438,0		

R. temporaria. Befruchtet: 25. III. 12h mittags. Bei 7° bis Beginn der Messung. Manometer geschlossen: 27. III, 10h 40′ a. m.; die Eier sind in diesem Zeitpunkt frisch, Blastulae. Im Versuch: 20 gallertfreie Eier, in S; der Versuch wurde 36 Stunden lang geführt; als Kontrolle: gleichzeitige Eier bei offenem Luftzutritt und Eier im großen, geschlossenen Gefäß mit Sauerstoff. Die Entwicklungsstadien im Respirationsglas und beiden Kontrollen gleichmäßig. Am Ende: ausgeschlüpfte Larven mit Kiemen. Im Respirationsglas 2 Embryonen nach etwa 60h zugrunde gegangen. Aus diesem Grunde in Kurve und Abbildung nur die ersten 52 Stunden angegeben.

Tabelle IV.

Reihe III (Abb. 4).

Zeit von Versuchsbeginn an	Temperatur in °	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn an				Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde				Nummer des entsprechenden Modells nach Ziegler
		Versuch 4 cmm	Versuch 7 cmm	Versuch 8 cmm	Versuch 1 cmm	Versuch 4 cmm	Versuch 7 cmm	Versuch 8 cmm	Versuch 1 cmm	
$14^h 10'$	13,5	53,7	53,7	77,0	72,3	173		248,2	233,5	18. Beginnende Neurulis
$18^h 20'$	14,5	74,75	74,5	104,1	99.3	252		324,0	323,0	
$24^h 40'$	15,2	104,5	106,5	150,0	141,4	250		362,0	332,0	
$39^h 25'$	15	191,5	171,0	302,0	314,5	257		515,0	586,0	17. Vor Kiemenausbruch

Reihe 3. R. temporaria. Befruchtung: 27. III. 11^h a. m., bis Versuchsbeginn bei 7°. Versuchsbeginn: 29. III. $6^h 30'$ p. m. Bei Beginn: Gastrulae.

Versuch 1: 20 Eier ohne Gallerte, Sauerstoff. Versuch 3: 20 Eier mit Gallerte, Sauerstoff. Versuch 4: 20 Eier mit Gallerte, Luft. Versuch 7: 20 Eier ohne Gallerte, Luft. Bei Versuchsende: alle Embryonen lebendig und gleichmäßig entwickelt; nicht ausgeschlüpfte Larven mit geschlossener Medullarrinne und kurzem Schwanz.

Tabelle V.

Reihe IX (Abb. 5 und 6).

Zeit seit Versuchsbeginn	Temperatur in °	Sauerstoffverbrauch für 20 Eier			Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde Durchschnitt 1 und 2 cmm	Nummer des entsprechenden Modells von Ziegler
		Versuch 1 cmm	Versuch 6 cmm	Versuch 2 cmm		
—	11,3	—	—	—		
$11^h 50'$	11,3	8,45	12,6	13,13	45,7	10. Blastula
24^h	11,3	19,16	25,2	25,2	46,9	
$33^h 30'$	11,3	30,55	36,6	34,6	52,6	10½. Beginnende Gastrula
38^h	11,2	34,6	38,6	35,9		
$41^h 10'$	11,2	39,25	42,4	42,0	63,7	11. Gastrula
$43^h 35'$	11,2	44,53	48,9	47,35		
$57^h 30'$	9,6	62,8	64,8	65,4	66,0	12. Gastrula
$61^h 30'$	11,3	67,5	68,55	69,4		
$65^h 15'$	11,2	75,0	76,05	77,0	74,8	12½. Gastrula
$65^h 30'$	11,2	75,4	76,50	77,4		
$67^h 20'$	11,1	79,1	77,5	78,7		
$81^h 40'$	11,1	107,8	100,3	107,5	100,5	
85^h	12,2	114,8	106,0	116,3		
$85^h 20'$	—	115,4	106,6	117,0	104,8	13. Gastrula. Beginn der Neuromedularhalter
$89^h 15'$	11,2	122,2	112,0	125,0		
$91^h 30'$	11,1	127,5	116,0	128,4		
105^h	12,8	171,7	151,6	175,0	151,9	

Rana temporaria. Befruchtung: 1^h p. m., 5. IV. Versuchsbeginn 6. IV. $12^h 30'$ a. m. Entwicklungsstadium zu Versuchsbeginn: frühe Blastula. In jedem Versuch 20 Eier, Gallerte beschnitten. Bei Versuchsende: späte Neurula. Im Versuch 1: alle Eier gleichmäßig entwickelt, übereinstimmend mit Kontrolle. Versuch 6: ein Teil der Eier verspätet. Versuch 2: 1 Ei tot.

Tabelle VI.

Reihe XII (Abb. 8).

Zeit von Versuchsbeginn an	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn an			Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde			
	Versuch 6 cmm O_2	Versuch 8 cmm O_2	Versuch 8 cmm O_2	Versuch 6 cmm	Versuch 8 cmm	Versuch 8 cmm	
0	—	—	—				
$17^h 30'$	189,2	194,0	166,0	540	554	479	20. Unverzweigte Kiemen
$23^h 48'$	254,2	263,0	228,8	520	556	582	
$40^h 28'$	430,0	441,0	394,0	530	532	496	
47^h	523,0	536,0	489,0	715	729	729	
65^h	732,0	747,0	712,8	582	586	621	

R. esculenta. Im Versuch je 16 ausgeschlüpfte Larven (Modell Nr. 20), umgerechnet auf 20 Larven. Luft: 15°.

Tabelle VII.

Reihe XVIII (Abb. 7).

Zeit von Versuchsbeginn an	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn an, für 20 Larven			Sauerstoffverbrauch für 1000 Eier und die Stunde			Nummer der entsprechenden Ziegler-Modelle
	Versuch 8 cmm O_2	Versuch 8 cmm O_2	Versuch 6 cmm O_2	Versuch 8 cmm	Versuch 8 cmm	Versuch 6 cmm	
$15^h 35'$	98,6	62,4	78,8	283	230	250	
24^h	135,6	108,0	117,0	257,5	225	244	17. Medullarrinne geschlossen
$39^h 25'$	215,0	175,0	180,4				
				253	230	207	18.
47^h	252,0	213,6	221,2	303	287	227	18½.
$65^h 10'$	364,0	316,0	319,0	—	—	270	
72^h	—	—	376,0	—	--	403	19. Äußere Kiemen
$88^h 30'$	—	—	506,0	—	—	394	
$111^h 30'$	—	—	752,0	—	—	534	19½.

Zu Versuchsbeginn: je 32 Eier in Gallerte, späte Neurula (Zieglers Modell 15). Die Zahlen sind auf 20 Eier umgerechnet. 15°. R. esculenta.

Tabelle VIII.

Reihe XIX (Abb. 8).

Zeit seit Versuchsbeginn	Sauerstoffverbrauch von Versuchsbeginn für 20 Embryonen			Sauerstoffverbrauch für 1000 Embryonen u. die Stunde			Nummer des entsprechenden Ziegler'schen Modells
	Versuch 7 cmm	Versuch 2 cmm	Versuch 4 cmm	Versuch 7 cmm	Versuch 2 cmm	Versuch 4 cmm	
15h 20′	86,0	95,0	79,4	264	262	270	18
24h	126	125,6	129,2	308	286	295	18½
48h	274,2	262,8	270,6	358	318	338	
64h 30′	392,4	368,0	382,0	450	406	419	19
72h	490,2	457,8	471,6	456	396	494	
95h 30′	703,6	643,8	703,6	568	492	510	19½
113h 10′	904,2	817,8	884,2	518	507	550	
119h 10′	970,2	882,2	954,0	527	512	566	
142h 45′	1215,2	1120,0	1217,2	596	524	675	
160h 45′	1429,6	1308,6	1460,2				
—	—	—	—	—	—	—	20

R. esculenta. Im Versuch je 16 Embryonen, umgerechnet auf 20. 15°.

Nr.	1	2	3	4	5
Gas	Luft	20 ccm H_2 2 ccm O_2	20 ccm H_2 1 ccm O_2	19 ccm H_2 1 ccm Luft	20 ccm H_2
3. IV.	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
4. IV.	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
5. IV.	Neurula	Neurula	Neurula		
6. IV.					
7. IV.					
8. IV.					

Abb. 9. Versuchsreihe V. 2. IV. wurden je 40 Eier in Pulverflaschen mit gut schließenden Glasstopfen eingebracht, die Flaschen mit ausgekochtem Brunnenwasser gefüllt und dann je 20 ccm der Gasgemische eingeleitet. Die geschlossenen Gläser sind in ein Wasserbad versenkt. Die Zimmertemperatur schwankt zwischen 10° und 14°. Am Versuchsende wurde der Sauerstoffgehalt des verbleibenden Gases bestimmt (Apparat von Peterson-Tobiesen).

Versuch 1: 20 ccm Luft.
„ 2: 20 ccm H_2 + 1 ccm O_2.
„ 3: 20 ccm H_2 + 1 ccm O_2. Am Versuchsschluß: 5,6% O_2.
„ 4: 19 ccm H_2 + 1 ccm Luft. „ „ 1,6% O_2.
„ 5: 20 ccm H_2. „ „ 0,6% O_2.

Alle 24 Stunden wurden die Embryonen gezeichnet.

Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
	20 ccm O_2	20 ccm Luft	10 ccm H_2 10 ccm Luft	17 ccm H_2 5 ccm Luft	19 ccm H_2 1 ccm Luft	20 ccm H_2	20 ccm H_2	Wasser (gasfrei)
5. IV.	16 Blastomeren	16 Blastomeren	16 Blastomeren	16 Blastomeren	8 Blastomeren	4 Blastomeren	4 Blastomeren	4 Blastomeren
6. IV.	Späte Blastula	Späte Blastula	Blastula	Blastula	Morula	Morula	64 Blastomeren	64 Blastomeren
7. IV.	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Blastula	Blastula	Blastula
8. IV.	Neurula	Neurula	Neurula	Neurula				
9. IV.			Neurula	Neurula				
10. IV.				Neurula				
11. IV.								

Abb. 10. Versuchsreihe VII. 4. IV. Dem Eileiter einer Temporaria ♀ entnommene Eier wurden schnell an der inneren Wand von Gläsern, wie in Reihe V einschichtig ausgestrichen, und mit einer kleinsten Menge konzentrierten Sperma befruchtet; nach 5 Minuten wurden die Gläser 2, 3, 4, 5, 6, 9 mit ausgekochtem, wasserstoffgesättigtem Wasser gefüllt — Gläser 1 und 2 nach 20 Minuten — und geschlossen; dann wurden sie — unter Wasser — mit je 20 ccm Gasmischung gefüllt. Die Gläser waren in ein Wasserbad getaucht, dessen Temperatur im Laufe der Tage zwischen 13° und 18° schwankte.

Versuch 1: 20 ccm O_2.
„ 2: 20 ccm Luft.
„ 3: 10 ccm H_2 + 10 ccm Luft.
„ 4: 17 ccm H_2 + 5 ccm Luft.
Versuch 5: 19 ccm H_2 + 1 ccm Luft.
„ 6: 20 ccm H_2.
„ 7: 20 ccm H_2.
„ 8: Wasser, H_2 gesättigt.

Alle 24 Stunden wurden die Embryonen gezeichnet.

	n/10-Uretan	n/20-Uretan	n/30-Uretan	n/40-Uretan	n/50-Uretan	Aqua font.
5. IV.	Unregelmäßige Furchen	64 Blastomeren	64 Blastomeren	64 Blastomeren	64 Blastomeren	64 Blastomeren
6. IV.		Frühe Blastula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
7. IV.			Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
8. IV.			Neurula	Neurula		
9. IV.						
10. IV.						
14. IV.						

Abb. 11. Versuchsreihe VIII. Am 4. IV. 5h 50′ p. m. werden die Eier einer Temporaria ♀ befruchtet; um 7h 50′ werden je ein Dutzend in Bechergläser eingebracht, welche Äthylurethanlösungen in Konzentrationen n/10, n/20, n/30, n/40 und n/50 enthalten. Alle Bechergläser stehen in derselben Küvette, in welcher sich die Hauptmenge der Eier entwickelt; die Temperatur des Wassers schwankt zwischen 13° und 18°. Die Entwicklungsstadien werden alle 24 Stunden durch Zeichnung festgelegt.

Nr.	1	2	3	4	5	6
	$^n/_{10}$-Uretan	$^n/_{20}$-Uretan	$^n/_{50}$-Uretan	$^n/_{100}$-Uretan	$^n/_{1000}$-Uretan	Wasser
2. IV.	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula	Blastula
3. IV.		Blastula	Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
4. IV.			Gastrula	Gastrula	Gastrula	Gastrula
5. IV.			Neurula	Neurula	Neurula	Neurula
6. IV.			Neurula			
7. IV.						
14. IV.						

Abb. 12. Versuchsreihe VI. 1. IV, 7h p. m. werden frühe Blastulae von R. temporaria in Bechergläser eingelegt, die $^n/_{10}$-, $^n/_{20}$-, $^n/_{50}$-, $^n/_{100}$-, $^n/_{1000}$-Äthylurethanlösungen enthalten. Versuch sonst wie Reihe VIII. Temperatur 10—18°.

	n/10-Uretan	n/20-Uretan	n/30-Uretan	Wasser
11. IV.				
12. IV.				
14. IV.				

Abb. 13. 10. IV. wurden frühe Gastrulae von R. temporaria in n/10-, n/20- und n/30-Äthylurethanlösungen eingebracht. Sonst wie Reihe VIII und VI.

	$^n/_{10}$-Uretan	$^n/_{20}$-Uretan	$^n/_{50}$-Uretan	$^n/_{100}$-Uretan	$^n/_{1000}$-Uretan	Wasser
2. IV.						
4. IV.						
6. IV.						
7. IV.						
14. IV.						

Abb. 14. Versuchsreihe VI a. Am 1. IV. wurden Neurulae von R. temporaria in $^n/_{10}$-, $^n/_{20}$-, $^n/_{50}$-, $^n/_{100}$- und $^n/_{1000}$-Äthylurethanlösungen eingelegt: wie Reihe VIII usw. In $^n/_{10}$-Urethan schließen sich die Medullarrinnen und die Embryonen entwickeln sich zu säbelförmigen Larven; nach 8 Tagen lebendig In $^n/_{20}$-Urethan noch am 28. IV. zwar unnormale, aber lebhaft bewegliche Larven.

Über den Einfluß spezifisch gebauter Jodverbindungen auf die Metamorphose von Froschlarven und vom Axolotl.

Von

J. Abelin.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 11. Januar 1921.)

Mit 12 Abbildungen im Text.

In einer früheren Mitteilung wurde über den Einfluß zweier chemisch nahe verwandter Verbindungen, des Tyramins und des Dijodtyramins, auf die Entwicklung von Froschlarven berichtet[1]. Es konnte dabei festgestellt werden, daß Dijodtyramin die Metamorphose der Froschlarven viel intensiver als das Tyramin beeinflußt. Es tauchte somit die Frage nach der Bedeutung des Jods für die Metamorphose von Froschlarven auf. Vorliegende Untersuchung bezweckte eine weitere Verfolgung der früher gemachten Beobachtung. Es galt nun, sowohl dem Dijodtyramin sehr nahe stehende Stoffe (wie Dijodtyrosin und jodhaltige Eiweißkörper), als auch verschieden konstituierte Jodverbindungen zum Vergleich heranzuziehen. Mit der gleichen früher beschriebenen Methodik wurden folgende Verbindungen untersucht:

K-, Na-, NH_4-Jodid	Dijodtyrosin
Kalium jodatum (KJO_3)	Jodalbacid
Lugolsche Lösung	Tyrosin
Dijodsalicylsäure	Kalium sozojodolicum
Dijodsalol	Dijod-dithymol (Aristol)
Jodopyrin	Jodgallicin
nichtjodierte Eiweißkörper	zahlreiche Normaltiere als Kontrolle.

Die bis jetzt (außer der Schilddrüse selbst) den Kaulquappen gegenüber als wirksam gefundenen Substanzen sind am besten

[1] Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Wirkung der proteinogenen Amine. IV. Mitt., diese Zeitschr. 102, 58.

in zwei Gruppen einzuteilen: 1. Stoffe, welche zwar die Metamorphose beeinflussen, sonst aber bei den Kaulquappen keine typischen Symptome einer Schilddrüsenwirkung hervorrufen (Plazentagewebe [Abderhalden], Tyramin, gewisse Fraktionen der Schilddrüsenstoffe, Prostatagewebe u. a.); 2. Stoffe, welche neben einer Beschleunigung der Metamorphose eine ganz charakteristische, der Schilddrüse sehr ähnliche Wirkung aufweisen[1]). Eine Entwicklungsbeschleunigung allein ist also noch keine Schilddrüsenwirkung. Die sehr schnell verlaufende und hauptsächlich frühzeitig eintretende Metamorphose nach Schilddrüsenverfütterung bedingt nämlich, daß viele lebenswichtige Organe in einem noch nicht funktionsfähigen Zustande zum Vorschein kommen. Die Anlagen der Dauerorgane des Frosches sind auch bei der Larve vorhanden. Während der Larvalzeit reifen diese Teile ganz allmählich. Wird aber die Larvalperiode durch Darreichung von Schilddrüse künstlich unterbrochen, so kann das Tier natürlich nur mangelhaft ausgebildete Organe zur Welt bringen [Jahrisch[2])]. Die Folge ist, daß der Verlauf der Metamorphose nach Schilddrüsenfütterung vom normalen Gang der Larvenumbildung abweicht. Wie bereits in der früheren Mitteilung erwähnt (S. 83), bestehen die Hauptsymptome der Metamorphose nach Schilddrüsengabe in einer ganz charakteristischen Atmung der Tiere, in der Resorption des Schwanzes vor Durchbruch der Vorderbeine usw.

Legt man den hier ausgeführten Versuchen nicht nur die Entwicklungsbeschleunigung, sondern auch die ganz typische Schilddrüsenwirkung zugrunde, so ergibt sich, daß nur Dijodtyrosin, Dijodtyramin und Jodalbacid wirksam waren. Die anderen organischen Jodsubstanzen, sowie das nicht jodierte Tyrosin waren ohne Wirkung. In betreff des Dijodtyrosins sei erwähnt, daß es auch in den Versuchen von M. Morse[3]) wirkte. Es wirkten also nur ganz spezifisch gebaute Jodverbindungen, und es ist interessant festzustellen, daß es sich dabei um physiologisch vorkommende, körpereigene Strukturen handelt.

---

[1]) Es wäre vielleicht noch eine Gruppe von Stoffen zu erwähnen, welche den Eintritt der Metamorphose verzögern (Thymus). Diese Stoffe kommen aber hier nicht in Betracht.

[2]) A. Jahrisch, Arch. f. d. ges. Physiol. 179, 159.

[3]) M. Morse, zit. nach Zentralbl. f. Physiol. 30, 133.

Im Dijodtyrosin ist das Jod an die biologisch wichtige Aminosäure, im Jodalbacid — an Albumosen und Peptone, im Dijodtyramin — an einen Aminosäureabkömmling — ein proteinogenes Amin gebunden. Das Dijodsalol oder die Dijodsalicylsäure enthält das Jod ebenso gebunden wie das Dijodtyrosin, das Jod steht ebenfalls in o-Stellung zum Hydroxyl, da aber das Gesamtmolekül einen anderen Aufbau hat, waren die Substanzen unwirksam. Es mußten also zwei wichtige Bedingungen vorliegen, damit die Substanz auf die Froschlarven wirkte: sie mußte erstens ganz spezifisch gebaut sein (in unserem Fall physiologisch ähnlich), sie mußte zweitens Jod enthalten. War eine dieser Bedingungen nicht erfüllt (Tyrosin, Jodopyrin u. a.), so war auch die typische Wirkung nicht zu erzielen. Es liegt hier ein Spezialfall einer verbreiteten und ganz gesetzmäßigen Erscheinung, die man auch bei anderen Stoffgruppen, wie z. B. den Schlafmitteln, findet. Auch hier kommt es ja nicht nur auf das Brom oder die Äthylgruppe, sondern zugleich auch auf die Gesamtstruktur an. Gerade bei den Schlafmitteln, wo es sich ebenfalls um die Auslösung eines physiologischen Vorganges handelt, ist in diesem Zusammenhange die Feststellung interessant, daß auch hier physiologisch ähnlich gebaute Stoffe (Harnstoff, Carbaminsäure, Oxypyrimidine, Hydantoin) gute Grundlagen zum Anheften wirksamer Gruppierungen (Br, Alkyl, Aryl usw.) darstellen. Ähnlich scheinen die Verhältnisse bei den jodhaltigen Verbindungen, welche den physiologischen Vorgang der Metamorphose beeinflussen, zu liegen.

Außer der Thyreoidea wurden von verschiedenen Autoren fast alle anderen Drüsen des tierischen Körpers geprüft. E. und M. Hoskins[1]) fanden neuerdings, daß der Vorderlappen der Hypophyse die Metamorphose normaler Tiere beschleunigt und bei schilddrüsenlosen Larven die Metamorphose hervorruft. Das benutzte Präparat (von Armour and Co.) war jodhaltig. E. C. Kendall fand darin Jod in einer Konzentration von 1 : 40 000, dies entspricht einem Jodgehalt der frischen Drüse von 1 : 200 000. Die Prostatadrüse wurde von Macht[2]) untersucht. Macht hat Larven verschiedener Amphibien (Rana

[1]) E. u. M. Hoskins, Endocrinology 4, 1. 1920; Ber. über d. ges. Physiologie 2, 572.

[2]) D. Macht, Ber. über d. ges. Physiologie 3, 575.

sylvatica, palustris, catesbiana; Bufo lentiginosus und Amblystoma punctata) ununterbrochen mehrere Wochen lang mit Prostatagewebe gefüttert. Das Ergebnis bestand in einer Entwicklungsbeschleunigung und Wachstumsförderung. Um eine typische Schilddrüsenwirkung kann es sich dabei nicht handeln, denn die Schilddrüsenstoffe wirken wachstumshemmend. Auffallend ist auch die sehr lange Dauer der Prostatafütterung; für die Schilddrüsenwirkung genügt dagegen eine 2—3malige Darreichung von Thyreoidea.

Von Wichtigkeit ist noch das Verhalten des anorganischen Jods. Hat Jod in Form der Jodlösung, der Alkalijodide oder Jodate einen Einfluß auf die Entwicklung und Metamorphose der Froschlarven? Die Literaturangaben darüber (sowie über die Wirkung jodierter Eiweißkörper) sind nicht übereinstimmend. Außer den bereits angeführten Untersuchungen[1]) sind die Arbeiten von Swingle[2]) zu erwähnen. Nach Swingle rufen geringe Mengen von Jod oder Jodalkalien eine Beschleunigung der Metamorphose hervor. Auch bei schilddrüsenlosen Larven, die sonst nicht metamorphosieren, wird nach Swingle durch Verfütterung von Jod oder Jodkalium die Metamorphose eingeleitet und zu Ende geführt. Diesen positiven Befunden Swingles stehen die Versuche von Romeis, Morx und Morse entgegen. Meine bisherigen Versuche mit anorganischen Jodiden waren negativ, es ist aber möglich, daß hier Konzentration des Jods, Gattung und Alter der Tiere, die Art der Ernährung usw. eine Rolle spielen. Swingle nahm z. B. außerordentlich verdünnte Lösungen von Jod (1 : mehrere Millionen), in meinen Versuchen waren die Jodkonzentrationen höher. Ich gedenke daher eine größere Anzahl von Versuchen mit Jodkali und Lugolscher Lösung unter veränderten Bedingungen anzustellen. Es sei nur erwähnt, daß in einem gegenwärtig (16. III. 21) noch im Gange befindlichen Versuch geringe Mengen von Lugolscher Lösung beim Axolotl mehrere Metamorphosen-Symptome ausgelöst haben. Ob die Metamorphose zu Ende gehen wird, läßt sich noch nicht sagen.

---

[1]) Vgl. Mitt. IV, diese Zeitschr. 102, 78.

[2]) Stringle, Journ. of General Physiol. 1, 593. 1919; 2, 161; Endocrinology 2, 284.

1. Versuche an Froschlarven.

I. Versuche mit 3-5-Dijodtyrosin.

OH
J⬡J
$CH_2CH(NH_2) \cdot COOH$

Das Dijodthyrosin wurde entweder in feiner Suspension oder in der berechneten Menge Natronlauge gelöst dem Wasser zugesetzt. Gewöhnlich wurden 10—20 mg zugegeben. Bei einer Wassermenge von 200 ccm ergab sich eine Dijodtyrosinverdünnung von 1 : 20 000 bis 1 : 10 000.

Versuch 1: Beginn des Versuches: 24. V. 1920.

Rana esculenta aus dem botanischen Garten.

Entwicklungsstadium: große, gut ernährte Kaulquappen, die Hinterbeinchen sind noch nicht ausgebildet, man sieht nur kleine Stummeln.

Zahl der Tiere: 5.

Mittlere Schwanzlänge	20,8 mm
„ Rumpflänge	12,0 „
„ Rumpfbreite	7,9 „

Die Wassermenge betrug 200 ccm. Vom Dijodtyrosin wurden zugesetzt: am 24. V. 10 mg, am 26. V. 15 mg, am 30. V. 15 mg, am 1. VI. 15 mg.

Die ersten Zeichen der Wirkung zeigten sich bereits am 1. VI.

3. VI. Bei 2 Tieren Zuspitzung der hinteren Körperteile, bei 3 Tieren sind die Hinterbeinchen deutlich größer geworden.

4. VI. Bei 2 Tieren ist der Mund nicht mehr larval, sondern breit mit Ober- und Unterkiefer, die Tiere sind auch abgemagert. Zusatz von 20 mg Dijodtyrosin.

5. VI. Bei noch einem Tier sind die Umbildungen am Mund ausgesprochen, die Abmagerung ist noch weiter fortgeschritten.

7. VI. Bei allen Tieren sind die Hinterbeinchen deutlich differenziert, die Augen sind vorspringend. Die Schwanzverkleinerung beginnt am 9. VI., an diesem Tag bricht bei einem Tier das rechte Vorderbeinchen durch.

10. VI. Die Einschmelzung des Schwanzes ist sehr deutlich, 1 Tier hat bereits 2 Vorderbeinchen, alle Versuchstiere haben einen Froschmund, die Atmung ist erschwert, die Tiere atmen unter Mitbewegung des ganzen Körpers, ganz wie nach Verfütterung von Schilddrüse.

11. VI. Außer den früher aufgezählten Symptomen tritt eine deutliche Farbenänderung der Haut auf. Am 12. VI. brechen die Vorderbeinchen bei noch einem Tier durch. 3 Tiere haben noch keine Vorderbeinchen, der Schwanz ist aber stark eingeschmolzen, bei 2 Tieren ist er ganz klein geworden, die Hinterbeinchen nehmen leicht Streckstellung ein.

13. VI. 2 Tiere mit Vorder- und Hinterbeinchen und nur ganz kleinem Schwanz sind tot, bei einem anderen Tier brechen die Vorderbeinchen durch.

Die Metamorphose der Tiere schreitet noch bis zum 16. VI. fort. Die Tiere sind schwächlich und werden mit 10 proz. Formalin abgetötet.

Kontrolle zu diesem Versuch.

Herkunft, Entwicklungsstadium, Größe der Tiere wie beim Versuch mit Dijodtyrosin. Diese Tiere sowie alle anderen Versuchstiere wurden mit gekochtem Fleisch gefüttert. Am 3. VI. waren bei einem Tier die Hinterbeinchen länger geworden, bei den anderen 4 Tieren waren sie nur unbedeutend länger als zu Beginn des Versuches. In den nachfolgenden Tagen zeigte nur das eine Tier eine zunehmende Differenzierung, die übrigen Tiere waren nur ganz wenig verändert. Am 16. VI., dem letzten Beobachtungstag, hatte nur 1 Tier 2 Vorderbeinchen, die Schwanzreduktion hatte eben begonnen; die übrigen Kontrolltiere waren noch im larvalen Stadium, eines von ihnen hatte Vorderbeinchen, die Hinterbeinchen waren nur bei 2 Tieren in Ober- und Unterschenkel differenziert, der Mund war larval mit Hornkiefer (vgl. Abb. 1, unterste Reihe). Das erste Tier rechts hat zwar Vorderbeinchen aber zugleich einen noch langen Schwanz. Bei den Versuchstieren der 2 oberen Reihen ist dagegen der Schwanz klein, die Vorderbeinchen schlecht ausgebildet.

Versuch 2: Beginn: 24. VI. 1920.

Rana esculenta. Herkunft: Tümpel an der Aare, gefangen anfangs Juni.

Entwicklungsstadium: mittelgroße Tiere, die Hinterbeinchen sind noch schwach entwickelt, keine Vorderbeinchen, Schwanz lang.

Zahl der Tiere: 8.

Mittlere Schwanzlänge	28,2 mm
„ Rumpflänge	13,8 „
„ Rumpfbreite	9,3 „

Die Wassermenge betrug wie in allen übrigen Versuchen 200 ccm. Zusätze von Dijodtyrosin: am 24. VI. 15 mg, am 25. VI. 10 mg, am 27. VI. 20 mg. Bis zum 27. VI. waren noch keine Körperveränderungen vorhanden, am 25. VI. sehr starke Kotentleerungen. Am 28. VI. waren bei 4 Tieren die Hinterbeinchen länger, es begann auch eine Körperzuspitzung. Am 29. VI. Nahrungsverweigerung. Die Kotentleerung ist sehr reichlich. Alle 8 Tiere haben die Hornkiefer abgeworfen, der breite Froschmund ist gut ausgebildet, die Hinterbeinchen sind länger geworden, die Atmung ist erschwert, die Hautfärbung erscheint heller, bei 4 Tieren ist der Schwanz deutlich verkürzt, bei den anderen 4 Tieren beginnt die Schwanzresorption. Die Augen sind stark vorgewölbt, der Spiraldarm ist verschwunden, bei 2 Tieren schimmern die vorderen Extremitäten durch. Besonders ausgesprochen ist die auch bei der Schilddrüsenwirkung auftretende erschwerte Atmung unter Mitbewegung des ganzen Körpers. Die Kontrolltiere sind dick, dunkel gefärbt, haben nur ganz kleine Hinterbeinchen, zeigen ganz normale Atmung, Spiraldarm.

30. VI. Bei 3 Tieren sind Vorderbeinchen durchgebrochen, rapide Schwanzreduktion, typische „Schilddrüsentiere“ mit kurzem Schwanz, breitem Kopf, zugespitztem Hinterleib.

Am 1. VII. haben 6 Versuchstiere Vorderbeinchen, 2 Tiere sind tot, unter den Kontrolltieren hat noch keine einzige Larve Vorderbeinchen oder Schwanzverkürzung (vgl. Abb. 3, NN 6 u. 7).

Versuch 3: Beginn: 25. VI. 1920.

Rana esculenta, gefangen am 23. VI. in einem Tümpel an der Aare. Mittelgroße Tiere mit nur kleinen Hinterbeinchen, Vorderbeinchen keine, langer Schwanz. 8 Tiere.

Mittlere	Schwanzlänge	32,0 mm
„	Rumpflänge	15,5 „
„	Rumpfbreite	10,0 „

Fütterung mit gekochtem Fleisch. Wassermenge 200 ccm. Zusätze von Dijodtyrosin: am 25. VI. 15 mg, am 27. VI. 20 mg, am 29. VI. 15 mg.

Am 27. VI. sind bei 3 Tieren die Hinterbeinchen länger geworden, am 28. VI. verschwand die Darmspirale. Am 29. VI. ist ein vorderes rechtes Beinchen durchgebrochen, beginnende Schwanzreduktion, bei 5 Tieren breiter Froschmund, erschwerte Atmung, Pulsieren des ganzen Körpers, helle Hautfärbung. Am 30. VI. sind bei 4 Tieren Vorderbeinchen durchgebrochen, der Schwanz dieser Tiere ist bedeutend kürzer geworden; am 1. VII. hatten schon 6 Tiere Vorderbeinchen und Schwanzreduktion. Von den 8 Kontrolltieren hat nur 1 Tier Vorderbeinchen.

2. VII. 2 Tiere haben vollständig metamorphosiert, der Schwanz ist verschwunden, sie sterben im Laufe des Tages. Bei 2 anderen Tieren ist der Schwanz stark reduziert, auch die Vorderbeinchen sind zum Vorschein gekommen, die Atmung der Tiere ist ruhiger geworden. Am 3. VII. gehen die meisten Tiere ein. Unter den Kontrollen haben 3 Vorderbeinchen, sie unterscheiden sich aber wesentlich von den Dijodtyrosintieren und von Schilddrüsentieren, in erster Linie durch den langen Schwanz und durch die langsame Schwanzresorption, auch die typische erschwerte Atmung fehlt vollkommen (vgl. Abb. 3, NN 4 u. 5).

Versuch 4: Beginn: 13. VII. 1920.

Rana esculenta, gefangen in einem Tümpel bei Muri. Junge Kaulquappen, die Hinterbeinchen sind kaum sichtbar, nur 1 Tier hat 4 mm lange Hinterbeinchen, Vorderbeinchen keine.

Zahl der Tiere: 5.

Mittlere	Schwanzlänge	18 mm
„	Rumpflänge	9,5 „
„	Rumpfbreite	6,2 „

200 ccm Wasser, Dijodtyrosin wurde nur zweimal zugesetzt, am 13. und 14. VII. je 20 mg.

Eine deutliche Wirkung konnte bereits am 15. VII. festgestellt werden: die Tiere haben eine veränderte Atmung (Mundbodenatmung) nebst kräftigen ununterbrochenen Bewegungen des ganzen Körpers.

16. VII. Bei sämtlichen Tieren ist der Spiraldarm verschwunden, Mund noch larval, Atemfrequenz 132 in der Minute, unter Bewegung des ganzen Körpers, bei 2 Tieren Schwanzreduktion.

17. VII. Rapide Verkleinerung des Schwanzes, bei 2 Tieren sind im Laufe des Tages Vorderbeinchen zum Vorschein gekommen, aber in Form von ganz zarten Stummeln. Bei 3 Tieren sind noch keine Vorderbeinchen vorhanden, aber der Schwanz ist beinahe ganz verschwunden (vgl. Kontrollversuch mit K,- Na-, NH_4-Jodid vom 13. VII.). (Vgl. Abb. 4, N 8). Die Kontrolltiere (N 9) stellen typische Larven dar. In N 10 dieser Abbildung ist eine andere Serie von Larven dargestellt, bei der erst gegen Ende Juli die normale Metamorphose eintritt. Der Unterschied gegenüber der oberen Reihe der gleichen Abbildung ist sehr deutlich: langer Schwanz, starke vordere Extremitäten.

Versuch 5: Beginn: 22. VII. 1920.

Rana esculenta, gefangen in einem Tümpel an der Aare. Junge große Kaulquappen ohne Hinterbeinchen; die Tiere haben großen Schwanz mit breiten Flossen. 4 Tiere.

Das Dijodtyrosin wurde in der berechneten Menge Natronlauge aufgelöst und als Na-Salz dem Wasser (200 ccm) zugesetzt. Als Futter wurde gekochtes Fleisch verwendet. Zusätze von Dijodtyrosin: am 22. VII. 20 mg, am 23. VII. 30 mg, am 24. VII. 30 mg, am 25. VII. 20 mg.

Am 26. VII., d. h. 4 Tage nach Beginn des Versuches, werden die Hornkiefer abgeworfen, die Mundgegend ist in Umbildung begriffen.

27. VII. Die Hinterbeine sind groß und dick, sie sind in Ober- und Unterschenkel gut differenziert, die Zehen und die Schwimmhäute sind ebenfalls gut ausgebildet. Die Schwanzflossen werden resorbiert, bei 2 Tieren ist auch eine Reduktion des Schwanzes sichtbar, bei einem Tier ist 1 linkes Vorderbeinchen durchgebrochen. Mundbodenatmung und Pulsieren des ganzen Körpers, die Haut hat eine mehr grüne Farbe angenommen.

29. VII. Die Atmung ist immer noch stark erschwert, der Schwanz wird immer mehr resorbiert, die Tiere haben charakteristische Geigenform, Vorderbeinchen bei 2 Tieren, bei 2 anderen Tieren seitliche Anschwellungen im vorderen Körperteil. Unter den Kontrolltieren hat keine einzige Larve Vorderbeinchen, die Hinterbeinchen sind ebenso wie zu Beginn des Versuches klein, die Tiere sind groß, der Darm ist spiralig gewunden, Mund larvål.

Am 30. VII. sterben plötzlich die Versuchstiere ab, wohl infolge einer Vergiftung. Es wurde ins Wasser etwas gekochtes Fleisch gelegt. Bei der hohen Außentemperatur trat rasch Fäulnis ein, die Tiere erstickten.

II. Kontrollversuch mit Tyrosin.

Beginn: 28. VII. 1920.

Esculentalarven aus einem Tümpel an der Aare, gefangen am 17. VII. Jüngere Larven mit langem Schwanz, kleinen Hinterbeinchen und ohne vordere Extremitäten. Tiere dieses Fanges und ganz ähnlichen Aussehens wurden auch zu den Versuchen mit Schilddrüsentabletten,

Dijodtyrosin, Jodalbacid verwendet. Fütterung mit gekochtem Fleisch, Wassermenge 200 ccm, Wasserwechsel jeden zweiten bis dritten Tag. 6 Tiere.

Mittlere Schwanzlänge	. . . .	24,0 mm
„ Rumpflänge	. . . .	11,5 „
„ Rumpfbreite	. . . .	8,0 „

Zusätze von Tyrosin: am 28. VII. 20 mg, am 29. VII. 30 mg, am 30. VII. 20 mg, am 1. VIII. 30 mg, am 3. VIII. 25 mg, am 5. und 7. VIII. je 30 mg.

Am 7. VIII. zeigen die Tiere keine Veränderung der Körperform auf. Die Hinterbeinchen sind etwas gewachsen, sind aber noch klein, Ober- und Unterschenkel lassen sich nur bei einigen Tieren unterscheiden, Hornkiefer vorhanden, keine Abmagerung, bei keinem Tier weder Vorderbeinchen noch Anschwellungen am vorderen Körperteil. Die Tiere wurden bis zum 17. VIII. weiter beobachtet, eine Entwicklungsbeschleunigung konnte nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 5, obere Reihe).

III. Versuche mit Jodalbacid.

Jodalbacid entsteht bei der Spaltung von jodiertem Eiweiß mittels Alkali. Es enthält 10% Jod[1]). Nach den Untersuchungen von A. Ostwald[2]) enthält Jodalbacid Dijodtyrosin.

Versuch 1: Beginn des Versuches: 12. VII. 1920.

Rana esculenta, gefangen in einem Tümpel bei Muri. Die Hinterbeinchen sind nur wenig differenziert, keine Vorderbeinchen. 4 Tiere.

Mittlere Schwanzlänge	. . . .	24,0 mm
„ Rumpflänge	. . . .	11,5 „
„ Rumpfbreite	. . . .	8,25 „
Länge der Hinterbeinchen	. . . .	6,5 „

200 ccm Wasser. 12. VII. Zugabe 1/2 Tablette Jodalbacid, am 13. VII. Wasserwechsel und Zugabe einer halben Tablette Jodalbacid. 14. VII. Wasserwechsel und Zugabe 1/2 Tablette. Bei 3 Tieren sind die Hinterbeinchen länger geworden, bei 1 Tier sind Hinterbeinchen von roter Farbe durchgebrochen. Die Tiere haben eine erschwerte Atmung und Zuspitzung der Körperform.

16. VII. Die Hornkiefer sind abgefallen. Sämtliche Tiere haben einen Froschmund, Atmung wie bei Schilddrüsentieren, Atemfrequenz 114 in der Minute. Der Schwanz ist bei allen Versuchstieren stark verkürzt, die Hinterbeinchen sind zwar länger geworden, aber noch nicht gut ausgebildet. 1 Tier hat ganz kleine, nur beim Schwimmen sichtbare Hinterbeinchen, der Schwanz ist aber trotzdem um die Hälfte verkürzt.

17. VII. Bei 3 Tieren sind Vorderbeinchen durchgebrochen, aber nur in Form von wenig differenzierten und pigmentlosen Stummeln. 1 Tier

[1]) S. Fränkel, Arzneimittelsynthese, III. Aufl., S. 597.

[2]) A. Oswald, Zeitschr. f. physiol. Chemie 70, 71, 74, 75.

hat noch keine Vorderbeine, aber trotzdem einen ganz kleinen Schwanz, der Mund ist ebenfalls nicht mehr larval, sondern breit, ohne Hornkiefer. Atmung sehr frequent, Augen vorgewölbt. Die Tiere sind wenig beweglich, liegen längere Zeit auf dem Rücken. In der Nacht auf den 18. VII. gehen die Tiere ein.

Versuch 2: Beginn: 24. VII. 1920.

Esculentenlarven, gefangen am 17. VII. an der Aare; 5 jüngere Tiere ohne Vorderbeinchen.

Mittlere Schwanzlänge	25,0 mm
„ Rumpflänge	12,5 „
„ Rumpfbreite	8,5 „

Zusätze von Jodalbacidtabletten: am 24. VII. 1/2 Tablette, am 26. VII. 1/2 Tablette, am 27. und 29. VII. und 1. VIII. je 1 Tablette.

Am 29. VII., also 5 Tage nach Beginn des Versuches, hatten die Tiere die charakteristische Geigenform, am Schwanz treten Zeichen einer beginnenden Resorption auf. Am 2. VIII. werden die Hornkiefer abgeworfen, der Schwanz ist deutlich verkürzt.

3. VIII. Atmung sehr erschwert (wie nach Verfütterung von Schilddrüse), Pulsieren des ganzen Körpers bei der Atmung, die Hinterbeinchen sind größer geworden, die Schwanzlänge nimmt rasch ab. Bei allen Tieren breiter Froschmund. Im Laufe der nachfolgenden Tage gehen die Tiere ein.

IV. Kontrollversuch mit Schilddrüsentabletten von Burroughs Wellcome and Co.

Beginn des Versuches: 18. VII. 1920.

Sehr große Kaulquappen mit langem Schwanz, keine Hinterbeinchen. Gefangen am 17. VII. in einem Tümpel an der Aare. 5 Tiere.

Mittlere Schwanzlänge	24,7 mm
„ Rumpflänge	13,5 „
„ Rumpfbreite	8,5 „

Verwendet wurde eine Aufschwemmung von 1 Tablette (à 0,324 g) in 10 ccm Wasser. Die Tiere befanden sich in einem Becherglas mit 200 ccm Wasser und wurden mit gekochtem Fleisch gefüttert. Zusätze der Schilddrüsentablettenaufschwemmung: am 18. VII. 3 ccm, am 19. VII. 3 ccm, am 20. VII. 3 ccm, am 22. VII. 3 ccm. Das Wasser wurde jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt. Am 22. VII. war die Atmung der Tiere sehr erschwert, das erste wichtige Zeichen einer Schilddrüsenwirkung; am 23. VII. wurden die Hornschuppen abgeworfen, die dargereichte Nahrung wurde nicht gefressen, die Atmung ist erschwert, der Schwanz wird kleiner. Am 24. VII. wird die Schwanzlänge bestimmt, sie betrug bei Tier I 9,5 mm, bei Tier II 12 mm, bei Tier III 14,1 mm, bei Tier IV 14 mm, bei Tier V 13,2 mm, im Mittel 12,4 mm gegenüber 24,7 mm zu Beginn des Versuches, der Schwanz ist also um die Hälfte kleiner geworden. Bei der Atmung wird der ganze Körper bewegt, Atemfrequenz 120—130 in der

Minute, Froschmund. Die Hinterbeinchen haben an Größe nicht zugenommen, keine Vorderbeinchen.

25. VII. Weitere Verkürzung des Schwanzes, Atemtypus wie am 24. VII. Auf der Bauchseite sieht man in der Gegend der vorderen Extremitätenanlagen Gasblasen, die synchron mit der Atmung pulsieren. Bei 2 Tieren sind seitliche Löcher durchgebrochen, die vorderen Extremitäten sind aber noch nicht zum Vorschein gekommen. Im Laufe des Tages sterben 2 Tiere.

27. VII. 3 Tiere leben, der Schwanz ist beinahe verschwunden, die Hinterbeinchen sind wenig differenziert, an Stelle der Vorderbeinchen sind nur pigmentlose Stummeln vorhanden, die Tiere liegen oft auf dem Rücken. Am 28. VII. gehen die Tiere ein.

Wir finden also in diesem Versuche die gleichen typischen Symptome wie nach Eingabe von Dijodtyrosin, Dijodtyramin oder Jodalbacid.

V. Vergleichsversuche mit anderen jodhaltigen Substanzen.

Versuch mit K-, Na-, NH_4-Jodid.

Beginn: 13. VII. 1920.

Rana esculenta, gefangen in einem Tümpel bei Muri.

Anzahl der Tiere: 5, davon haben 4 Tiere sehr kleine, kaum sichtbare Hinterbeinchen, bei 1 Tier sind dagegen die Hinterbeinchen etwa 5 mm lang und gut differenziert.

Mittlere	Schwanzlänge	18,5 mm
„	Rumpflänge	9,5 „
„	Rumpfbreite	6,2 „

Verwendet wurde eine Lösung, welche aus $^n/_{300}$-KJ + $^n/_{300}$-NaJ + $^n/_{300}$-NH_4J bestand.

13. VII. 200 ccm Wasser + 3 ccm der Mischung.

14. VII. Fütterung mit rohem Fleisch, Zusatz von 5 ccm der Mischung.

15. VII. Bei einem Tier sind die Hinterbeinchen länger geworden, Wasserwechsel und Zusatz von 8 ccm der Jodsalzlösung.

16. VII. Die Tiere haben ein ganz anderes Aussehen als diejenigen mit Dijodtyrosin und Jodalbacid gefütterten, die Atmung ist ruhig und nicht beschleunigt, die Hinterbeinchen sind klein und dünn. Nur 1 Tier hat wie zu Beginn des Versuches dickere Hinterbeinchen, der Mund ist aber noch larval, der Schwanz ist lang. Zusatz von 10 ccm der Lösung.

18. VII. Wasserwechsel, bis jetzt sind keine weiteren Veränderungen an den Tieren zu sehen. Die mit Dijodtyrosin und Jodalbacid behandelten Tiere haben bereits metamorphosiert (vgl. Versuch 4 mit Dijodtyrosin und Versuch 1 mit Jodalbacid). Am 19. VII. Zusatz von 15 ccm, am 20. VII. Zusatz von 20 ccm der Lösung. Bei 3 Tieren läßt sich eine geringe Abmagerung am Unterleib erkennen.

25. VII. 1 Tier hat 2 Vorderbeinchen, aber einen sehr langen Schwanz, kein Aussehen eines Schilddrüsentieres; bei den anderen Tieren keine wesentliche Veränderung der Körperform, Mund larval mit Hornkiefer. Zusatz von 20 ccm der Lösung.

26. VII. Noch 1 Tier bekommt ein Vorderbeinchen.

27. VII. Die Schwanzresorption bei den 2 Tieren mit Vorderbeinchen geht sehr langsam, der Schwanz ist lang, Atmung normal, bei den 2 anderen Tieren keine Symptome einer Metamorphose. Zusatz von 10 ccm der Mischung. Seit dem 13. VII. wurden insgesamt 100 ccm der Jodsalzlösung zugesetzt.

28. VII. Wasserwechsel, von den beiden metamorphosierten Tieren hat eins noch einen langen Schwanz. Bei 2 Tieren noch keine Hinterbeinchen, kein Froschmund. Am 30. VII. sterben die beiden metamorphosierten Tiere, die 2 anderen Tiere zeigen auch am 1. VIII. keine Veränderung.

Versuch mit Lugolscher Lösung.

Beginn: 11. VII. 1920.

Rana esculenta, gefangen in einem Tümpel an der Aare. Kleine Larven, die Hinterbeinchen sind sehr zart und bei der Betrachtung der Tiere von oben nicht sichtbar. 3 Tiere.

Mittlere	Schwanzlänge	19,0 mm
„	Rumpflänge	9,0 „
„	Rumpfbreite	4,8 „

Verwendet wurde eine 10fach verdünnte Lugolsche Stammlösung. Von dieser Lösung wurde zu den 200 ccm Wasser, in welchem sich die Tiere befanden, zugesetzt: am 11. VII. 0,2 ccm, am 12. VII. 0,3 ccm, am 13. VII. 0,5 ccm, am 14. VII. 0,6 ccm, am 15. VII. 1 ccm, am 16. VII. 0,5 ccm, am 19. VII. 0,5 ccm.

Am 19. VII. waren die Hinterbeinchen ganz klein und nicht differenziert, die mit Dijodtyrosin und Jodalbacid behandelten Tiere waren zu dieser Zeit bereits metamorphosiert.

20. VII. Es treten geringe Zeichen einer Schwanzverkleinerung auf, in der Mundgegend ebenfalls geringgradige Veränderungen, die Atmung ist normal. Zusatz von 0,5 ccm der Lösung.

21. VII. Keine Vorderbeinchen, Zusatz von 1 ccm der Lösung. Am 22. VII. gehen 2 Tiere ein, der Schwanz ist deutlich kleiner geworden, die Hinterbeinchen sind größer als bei den Kontrolltieren, das dritte Tier starb am 31. VII. und hatte noch einen relativ langen Schwanz, es hatte nicht das Aussehen eines Schilddrüsentieres.

Es sind also Zeichen einer Wirkung vorhanden. Wegen Tiermangel konnte der Versuch leider nicht wiederholt werden.

Versuch mit Kaliumjodatum (KJO_3).

Verwendet wurde eine $^{n}/_{10}$-Lösung. Der Versuch begann am 18. VII. 1920. Die Tiere stammten aus einem Tümpel an der Aare, sie hatten keine Hinterbeinchen. 5 Larven.

Mittlere	Schwanzlänge	20,0 mm
„	Rumpflänge	10,0 „
„	Rumpfbreite	7,2 „

Zu je 200 ccm Wasser wurden von der $^n/_{10}$-KJO_3-Lösung zugesetzt: am 18. VII. 0,5 ccm, am 19. VII. 1 ccm, am 20. VII. 1,5 ccm, am 21. VII. 2 ccm, am 22. VII. 1 ccm und am 24. VII. 1 ccm.

27. VII. Die Tiere sind mager, Mund larval, Schwanzspitze etwas gebogen. Kein Aussehen von metamorphosierenden Larven. Zusatz von 1 ccm der $^n/_{10}$-KJO_3-Lösung.

28. VII. Alle Tiere sind tot.

Versuch mit Dijodsalol.

Beginn: 20. VII. 1920.

Esculentalarven aus einem Tümpel an der Aare, junge kräftige Tiere ohne Hinterbeinchen.

Mittlere Schwanzlänge	. . . .	32,0 mm
„ Rumpflänge	. . . .	13,2 „
„ Rumpfbreite	. . . .	8,5 „

4 Tiere. 0,465 g Dijodsalol wurden in 10 ccm Wasser suspendiert ($^n/_{10}$), die Tiere wurden mit gekochtem Fleisch gefüttert. Zusätze der Dijodsalolsuspension: am 20. VII. 1 ccm, am 22. und 25. VII. je 1 ccm, am 27. VII. 1,5 ccm, am 30. VII. und 1. VIII. je 1 ccm. Es war keine wesentliche Veränderung an den Tieren festzustellen, die Hinterbeinchen sind nur wenig gewachsen, Hornkiefer vorhanden, keine Vorderbeinchen.

Versuch mit Dijodsalicylsäure.

Beginn: 20. VII. 1920.

Esculentalarven. Herkunft und Entwicklungsstadium wie im Versuch mit Dijodsalol. 3 Tiere.

Mittlere Schwanzlänge	. . . .	24,5 mm
„ Rumpflänge	. . . .	12,0 „
„ Rumpfbreite	. . . .	6,7 „

Es wurde eine Suspension von 0,39 g Dijodsalicylsäure in 10 ccm Wasser ($^n/_{10}$) verwendet. Von dieser Suspension wurde je 1 ccm an verschiedenen Tagen zugesetzt. Die Tiere wurden bis zum 4. VIII. beobachtet, es konnte kein Zeichen einer Entwicklungsbeschleunigung oder einer rascheren Metamorphose festgestellt werden: Hornkiefer vorhanden, kleine Hinterbeinchen, keine vorderen Extremitäten, keine Abmagerung.

Versuch mit Kalium sozojodolicum.

Beginn: 20. VII. 1920.

Zahl der Versuchstiere: 5. Tiere gleichen Fanges und gleichen Aussehens wie in den Versuchen mit Dijodsalol und Dijodsalicylsäure.

Mittlere Schwanzlänge	. . . .	22,0 mm
„ Rumpflänge	. . . .	10,0 „
„ Rumpfbreite	. . . .	6,5 „

Vom Kalium sozojodolicum wurde eine Suspension von 0,465 g in 10 ccm Wasser hergestellt ($^n/_{10}$). Jedesmal wurde 1,0—1,5 ccm dieser Suspension dem Wasser zugesetzt. Beobachtungsdauer bis zum 4. VIII. Keine Wirkung (s. Photographie).

Versuch mit Jodopyrin.

Beginn: 20. VII. 1920.

Beschreibung der Tiere s. in den Versuchen mit Dijodsalol und Dijodsalicylsäure. 4 Tiere.

Mittlere Schwanzlänge	26,0 mm
„ Rumpflänge	13,5 „
„ Rumpfbreite	8,2 „

0,31 g Jodopyrin wurden in 10 ccm Wasser aufgeschwemmt, 1,0 bis 1,5 ccm Suspension wurden jedesmal zugesetzt. Am 27. VII. hat 1 Tier ein Ödem, der Spiraldarm ist stark aufgetrieben, das Tier stirbt im Laufe des Tages. Die anderen 3 Tiere wurden bis zum 4. VIII. beobachtet, keine Entwicklungsbeschleunigung.

Versuch mit Dithymoldijodid (Aristol).

Beginn: 22. VII. 1920.

4 Tiere, Esculentalarven aus einem Tümpel an der Aare. Junge Tiere mit langem Schwanz und ganz kleinen Hinterbeinen. Am 22., 24. und 26. VII. wurden je 2 Tropfen einer Suspension von 0,45 g Aristol in 10 ccm Wasser zugesetzt. Am 27. und 30. VII. wurden je 0,5 ccm, am 1. VIII. 0,8 ccm der Suspension zugesetzt. Bis 4. VIII. keine Wirkung.

Versuch mit Jodgallicin.

Beginn: 24. VII. 1920.

3 Esculentalarven aus einem Tümpel an der Aare. Größe und Entwicklungsstadium der Tiere wie im Versuch mit Dijodsalicylsäure. 0,5 g Jodgallicin wurden in 10 ccm Wasser suspendiert. Zusätze: am 24. und 26. VII. je 2 Tropfen, am 27. VII. 0,5 ccm, am 30 VII 0,5 ccm, am 1. VIII. 0,75 ccm der Suspension. Die Larven haben bis zum 4. VIII. ihr Aussehen nicht verändert: Spiraldarm, larvale Mundöffnung, keine Vorderbeine, sehr langer Schwanz.

2. Versuche am Axolotl.

Während bei der Froschlarve die Metamorphose sozusagen eine obligate Erscheinung ist, gibt es einige Tiere, die lebenslang im larvalen Zustande bleiben. Ein solches Tier ist der sog. Axolotl. Als eine Larve in Dauerform behält es auch die larvalen Organe, z. B. die Kiemen, den Rückensaum usw. Die larvale Form des Axolotl wurde lange Zeit als die endgültige angesehen. Marie v. Chauvin hat nachgewiesen, daß der Axolotl ebenso

wie jede andere Larve metamorphosieren kann. Sie erzielte die Metamorphose durch vorsichtiges und allmähliches Angewöhnen der Tiere an das Atmen an der Luft. Nach dem Bekanntwerden der Gudernatschen Versuche war es wichtig, die Wirkung der Schilddrüsenstoffe auf die Metamorphose des Axolotl zu prüfen. J. Huxley[1]) hat vor kurzem nachgewiesen, daß es auch durch Verfütterung von Schilddrüsensubstanz gelingt, beim Axolotl die Metamorphose hervorzurufen. Bei den vielen Beziehungen, die sich in den angeführten Versuchen zwischen Thyreoideasubstanzen einerseits und Dijodtyramin und Dijodtyrosin andererseits ergeben haben, interessierte mich das Verhalten des Axolotls dem Dijodtyrosin gegenüber. In der Tat gelang es durch Eingabe von Dijodtyrosin ganz ebenso wie durch Schilddrüsenfütterung den Axolotl zur Metamorphose zu zwingen. Der Verlauf der Metamorphose und die Endform des Tieres ist in beiden Fällen die gleiche und es ist äußerlich nicht zu unterscheiden, welches Tier unter dem Einflusse von Schilddrüse und welches unter Dijodtyrosinwirkung metamorphosiert hat.

Den Eintritt der Metamorphose beim Axolotl kann man, worauf mich Prof. Asher bei der Diskussion der Ergebnisse aufmerksam machte, unter der Annahme erklären, daß durch die Ernährung mit Schilddrüsenpräparaten das Sauerstoffbedürfnis der Organismen wesentlich gesteigert wird. Zahlreiche Untersuchungen des Berner Physiologischen Instituts, insbesondere die zuletzt erschienene Arbeit von Durand[2]), haben gezeigt, daß nach Schilddrüseneinnahme die Tiere empfindlicher gegen Sauerstoffmangel werden. Ein größeres Sauerstoffbedürfnis beim Axolotl würde das Tier nötigen, immer mehr zur Lungenatmung überzugehen, und dies würde schließlich zum Verlust der Kiemen und zur Metamorphose führen. Einen Anhaltspunkt für diese Auffassung liefert auch die Tatsache, daß Axolotltiere metamorphosieren, wenn sie längere Zeit in ausgekochtem Wasser gehalten werden. Auch hier stellt wahrscheinlich der Sauerstoffmangel infolge des verminderten Sauerstoffgehaltes des Wassers den auslösenden Faktor dar.

---

[1]) J. Huxley, Nature 1920.

[2]) Leon Asher, Beiträge zur Physiologie der Drüsen. 44. Mitteilung von M. Durand. Diese Zeitschr. 106, 254.

Die Tiere wurden täglich mit Würmern, Schnecken oder mit Fleisch gefüttert. Das Wasser wurde jeden Tag gewechselt, immer kam nur Wasser von Zimmertemperatur zur Anwendung. Die Thyreoideatabletten wurden von den Tieren gern genommen, das Dijodtyrosin wurde zuerst in Fleisch eingehüllt verfüttert. Nach einiger Zeit wollten aber die Tiere solches Fleisch nicht mehr aufnehmen. Das Dijodtyrosin wurde dann in der berechneten Menge NaOH gelöst und subcutan in die Schwanzgegend eingespritzt. Die Dauer der Metamorphose schwankte zwischen 6—8 Wochen. Während der Metamorphose hungerten die Tiere öfters. Sowohl im Versuch mit Dijodtyrosin als auch im Kontrollversuch mit Schilddrüsenfütterung trat auffallenderweise nach den ersten Zeichen der Metamorphose eine Erholung ein. Die Tiere wurden wieder lebhafter, die anfangs etwas kleiner gewordenen Kiemen wuchsen wieder, es entwickelten sich auch neue Kiemenfäden (vgl. Versuch 2 und Kontrollversuch). Erst nach weiterer Eingabe der fraglichen Substanzen bildete sich der Metamorphosezustand endgültig aus. Die Verwendung des Axolotl zu Metamorphosestudien hat den Vorteil, daß sich die einzelnen Vorgänge der Umbildung viel besser übersehen lassen als an Froschlarven. Nach der Metamorphose bleiben die Axolotl am Leben und können weiter beobachtet werden, während die Froschlarven nach einer künstlich beschleunigten Metamorphose unfehlbar zugrunde gehen.

Versuche mit Dijodtyrosin.

Versuch 1: Axolotl schwarz, kleineres Tier. Gesamtlänge 115 mm. Das Tier befand sich in einer Schale mit 600 ccm Wasser Zu diesem Wasser wurde Dijodtyrosin zugesetzt, zuerst nur 10 mg, in den nachfolgenden Tagen wurde bei jedem Wasserwechsel die zugegebene Dijodtyrosinmenge immer erhöht, also 20, 30, 40 und 60 mg. Ein deutlicher Erfolg ließ sich nicht feststellen. An der Haut traten nur vereinzelte goldgelbe Flecken auf. Es wurde daher versucht, das Dijodtyrosin subcutan einzuspritzen. Am 9. IX. wurden 10 mg und am 11. IX. 17 mg Dijodtyrosin-Na eingespritzt. Von der Haut des Tieres lösen sich farblose Platten ab, das Wasser ist getrübt. In Fleisch eingehüllt nimmt das Tier am 15. IX. 40 mg, am 17. IX. 70 mg und am 18. IX. 40 mg Dijodtyrosin auf. Am 20. IX. beginnt eine Hungerperiode, zugleich treten auch starke Formveränderungen des Tieres auf. Der Mundrand ist nicht mehr breit-oval, sondern zugespitzt, dreieckig; die Augen springen sehr stark vor, der Flossensaum ist zum großen Teil resorbiert. Während er zu Beginn des Versuches dicht am Kopfe begann, beginnt er jetzt erst an den Hinterbeinen. Zahlreiche neue Hautflecken. Die Kiemenbüschel sind etwas kleiner geworden, sie stehen nicht mehr vertikal, sondern liegen beinahe horizontal. Das Tier hungert bis zum 27. IX.

28. IX. Die Kiemen werden immer mehr resorbiert, das Tier kommt in eine Schale mit 300 ccm Wasser + 30 mg Dijodtyrosin.

2. X. Zu 300 ccm Wasser werden 15 mg Dijodtyrosin zugesetzt. Die Kiemen sind jetzt etwa nur halb so lang wie zu Versuchsbeginn. Am 5. X. 3 mg, am 8. X. 5 mg Dijodtyrosin per os (in Fleisch).

8. X. Links sind fast keine Kiemenbüschel vorhanden, rechts sind sie noch gut erkennbar.

10. X. Keine Büschel mehr, an deren Stelle befinden sich nur kleine, nach abwärts gebogene Plättchen. Der Kopf wird außerhalb des Wassers gehalten, das Tier bleibt an der Luft einige Minuten ganz ruhig.

Vom 8. bis 15. X. hungerte das Tier wieder. Fortwährend werden große Hautpartien abgestoßen, die Augen bleiben vorspringend, der Rückensaum ist bereits am 12. X. vollkommen verschwunden. In der nachfolgenden Zeit lebt das Tier frei an der Luft.

Versuch 2: Beginn des Versuches: 1. X. 1920.

Axolotl schwarz, Gesamtlänge 152 mm, Länge des Rückensaumes 120,1 mm.

Die einzelnen Kiemenfäden sind groß und gut entwickelt, ihre Größe schwankt zwischen 2,8 und 5 mm; der Mund ist breit, keine Hautflecke, kein Abstoßen von Epidermis.

Am 2. X. Eingabe von 10 mg Dijodtyrosin mit rohem Fleisch. Am 3. und 4. X. nimmt das Tier keine Nahrung auf, während es früher immer begierig fraß. Die Kiemenmessungen ergeben keine Größenveränderung, nur sind die einzelnen Fäden verändert, Epidermisabschuppung. Das Tier wird in eine Lösung von 15 mg Dijodtyrosin in 400 ccm Wasser gebracht. Am 5. X. 5 mg, am 7. und 8. X. je 10 mg Dijodtyrosin mit Fleisch. Am 8. X. treten am Rücken Hautflecke auf, viele Fäden an den Kiemenbüscheln sind verkümmert. Am 9., 10., 12. und 13. X. je 10 mg Dijodtyrosin mit Fleisch, außerdem am 12. und 13. X. je 1 Wurm. Vom 14. bis zum 16. X. hungert das Tier. An den Kiemen, am Rückensaum, an den Augen keine neuen Veränderungen. Am 16. X. 20 mg, am 17. X. 10 mg Dijodtyrosin mit Fleisch. Am 18. und 19. X. keine Nahrungsaufnahme. Am 20. X. 1 Wurm, am 21. X. 15 mg Dijodtyrosin mit 1 Wurm. Vom 14. bis 21. X. hat das Tier große Schwierigkeiten beim Fangen der Nahrung. Während früher Fleisch und Würmer sehr schnell und mit großem Geschick gefangen wurden, muß jetzt die Nahrung 1—2 Minuten vor dem Munde gehalten werden, bis sie genommen wird. 23. X. Das Tier hat wieder sein normales Aussehen erhalten, an den Kiemenbüscheln sind viele neue Fäden aufgetreten, die Kiemen stehen wieder vertikal, das Tier ist lebhaft, frißt viel, fängt leicht die Nahrung. Am 24. und 25. X. je 35 mg Dijodtyrosin mit Fleisch, kein Exophthalmus, keine Häutung, keine Resorption des Rückensaumes. 26. bis 27. X. Nahrungsverweigerung, das Wasser ist stark trüb, die Kiemenbüschel sind wieder in mehr horizontaler Stellung, die einzelnen Fäden sind leicht gebogen. Da das Tier das Fleisch mit Dijodtyrosin nicht mehr aufnimmt, wird zur subcutanen Einverleibung des Präparates übergegangen. Am 28. X. Injektion von 20 mg, am 30. X. und 1. XI. von je 25 mg Dijodtyrosin. Keine auffallenden Veränderungen bis zum 2. XI. Am 3. XI. beginnt die Häutung. Das Tier erhält am 4. XI. 20 mg Dijodtyrosin per os, am 5. XI. 25 mg subcutan, am 9. XI. 20 mg subcutan.

Seit dem 5. XI. nimmt die Größe der Kiemenbüschel sowie der einzelnen Fäden wesentlich ab. Am 9. XI. ist auch ein starkes Vorspringen der Augen festzustellen. Am Rücken einzelne Hautflecke. In den nach-

folgenden Tagen (10. bis 16. XI.) nimmt die Reduktion der Kiemen und des Rückensaumes immer zu, das Tier ist wenig beweglich, frißt einmal in 3—4 Tagen, Augen vorspringend, starke Häutung. Am 16. XI. beginnt eine Hungerperiode, die bis zum 29. XI. dauert. Während dieser Zeit hatte das Tier ausgedehnte Häutung, die Zahl der Hautflecke ist bei diesem Tier viel kleiner als bei den anderen Tieren. Die letzten Überreste der Kiemenbüschel verschwinden zwischen dem 27. bis 30. XI. Seit dem 29. XI. ziemlich regelmäßige, aber immerhin erschwerte Nahrungsaufnahme. Nahrungsverweigerung nur selten. Das Tier hält die Nasenlöcher außerhalb des Wassers und kann auch einige Minuten an der Luft ganz ruhig bleiben. Es befindet sich in einer flachen Schale mit sehr wenig Wasser. Nach einigen Tagen erträgt das Tier den Aufenthalt im Wasser nicht mehr, es wird an der Luft gehalten.

Tabelle I.

Kiemengröße des mit Dijodtyrosin gefütterten Axolotl in verschiedenen Stadien der Metamorphose.

Paar		Am 1. Oktober 1920 (Versuchsbeginn) mm	Am 4. Oktober 1920 mm	Am 11. Oktober 1920 mm	Am 23. Oktober 1920 mm	Am 10. Novemb. 1920 mm	Am 13. Novemb. 1920 mm	Am 17. Novemb. 1920 mm	Am 26. Novemb. 1920 mm	Am 28. Novemb. 1920 mm	Am 30. Novemb. 1920 mm
I.	rechts...	10,1	10,1	10,0	10,0	10,0	6,5	4,0	2,1	0,0	0,0
	links....	15,0	15,0	12,5	14,0	11,2	9,8	7,2	2,0	0,5	0,0
II.	rechts...	12,2	12,2	12,0	12,5	10,2	9,1	6,2	3,0	0,7	0,0
	links....	12,0	12,0	11,1	12,0	10,9	9,0	6,8	2,8	0,3	0,0
III.	rechts...	10,3	10,1	8,2	9,2	8,2	7,0	4,1	1,9	0,0	0,0
	links....	11,1	11,0	8,5	9,6	9,1	7,5	5,0	0,0	0,0	0,0

Auffallend an dieser Tabelle ist zuerst die Verkleinerung und dann das neue Wachstum der Kiemen (vgl. die Zahlen vom 11. und 23. Okt.). Der Axolotl zeichnet sich durch sehr starke Regenerationsfähigkeit aus. Man kann einzelne Kiemen ganz abschneiden, nach einiger Zeit werden sie ersetzt, der Versuch kann fünf- bis sechsmal wiederholt werden (Dumeril).

Kontrollversuch mit Verfütterung von Schilddrüsensubstanz.

Axolotl schwarz, Gesamtlänge 151 mm, breiter Mundrand, gut entwickelter Rückensaum, Vorderbeinchen 25—27 mm.

Ebenso wie beim Dijodtyrosin kamen auch in diesem Versuch zuerst sehr geringe Thyreoideamengen zur Anwendung. 1 Schilddrüsentablette à 0,324 g (von Burroughs Wellcome) wurde in 10 ccm Wasser suspendiert, davon wurde 1 ccm auf 500 ccm Wasser verdünnt. In dieser äußerst verdünnten Aufschwemmung befand sich nun das Tier. Die Suspension wurde jeden Tag gewechselt. Der Versuch begann am 10. VIII. 1920. Bereits

am vierten Tage nach Versuchsbeginn konnten deutliche Veränderungen festgestellt werden: Abstoßung der Epidermis, die Hautfärbung ist etwas verändert, der Schwanz ist etwas gekrümmt. Es wurden dann in der nachfolgenden Zeit jeden Tag 1–2 ccm der Thyreoideasuspension dem Wasser zugesetzt. Außerdem erhielt das Tier täglich 1 Wurm. Am 18. VIII. waren auch die Kiemen stark verändert, sie liegen flach dem Körper an, das dritte (unterste) Kiemenpaar ist fast ganz verkümmert und hat keinen Fadenkranz. Die Haut ist dicht pigmentiert, das Tier ist schwächlich, wenig beweglich. Am 25. VIII. erscheinen die Kiemen etwas gebogen, zum Teil ohne Epidermis, die Zahl der Kiemenfäden hat sich erheblich vermindert. Aus äußeren Gründen hat das Tier vom 25. VIII. bis zum 4. IX. keinen Thyreoideazusatz bekommen, es hat in dieser Zwischenzeit sich von den Folgen der Thyreoideazufuhr erholt. Die Kiemen stehen nun wieder vertikal, es sind auch zahlreiche neue Kiemenfäden aufgetreten; das Tier ist wieder kräftig und lebhaft. Am 4. IX. wird mit der Zugabe der Thyreoideasuspension begonnen; am 4., 6. und 7. IX. werden dem Wasser je 4 ccm, am 9. IX. 2 ccm der Tablettenaufschwemmung hinzugefügt. Da in den letzten Tagen keine Veränderungen am Tier festzustellen sind, wird die Schilddrüsensubstanz per os eingegeben. Vom 13. bis 18. IX. nimmt das Tier die erste Schilddrüsentablette (Burroughs Wellcome à 0,324), vom 20. bis 27. IX. die zweite Tablette auf. Am 25. IX. erscheint das dritte Kiemenpaar etwas gekrümmt, die Augen sind vorspringend. Vom 27. IX. bis 7. X. wird die dritte, vom 7. bis 11. X. die vierte und vom 11. bis 13. X. die fünfte Schilddrüsentablette verfüttert. Bereits am 9. X. beginnt eine starke Abstoßung von Epidermis, die Kiemen sind kleiner geworden, starker Exophthalmus. Am 14. X. ist der allergrößte Teil des Rückensaumes resorbiert, die Kiemen sind klein, der Mund spitzwinklig, das Tier ist abgemagert, trotzdem daß es täglich frißt. Im Laufe der nächsten 2 Wochen ist die äußere Metamorphose abgeschlossen, die Kiemen sind sehr klein, vom Rückensaum ist nur noch ein kleiner Überrest geblieben, fortwährend hat das Tier ausgedehnte Verluste von Epidermis, der Kopf wird immer außerhalb des Wassers gehalten. Die Nahrungsaufnahme ist er-

Tabelle II.

Kiemengröße des mit Schilddrüsentabletten gefütterten Axolotl in verschiedenen Stadien der Metamorphose.

Paar	Am 10. Aug. 1920 mm	Am 11. Okt. 1920 mm	Am 19. Okt. 1920 mm	Am 25. Okt. 1920 mm	Am 2. Nov. 1920 mm
I. rechts . . .	10,0	8,7	7,0	3,1	0,0
links	12,7	7,7	6,1	2,8	0,0
II. rechts . . .	11,8	9,1	6,3	2,9	0,0
links	11,9	4,3	4,1	1,9	0,0
III. rechts . . .	10,1	4,8	3,0	1,5	0,0
links	10,9	5,9	5,1	2,7	0,0

schwert. Am 24. XI. verläßt das Tier das Wasserbecken und wird versteckt in der Zimmerecke aufgefunden. Seitdem lebt es frei an der Luft. Zur gleichen Zeit begann auch eine Hungerperiode, die vom 22. bis 27. XI. dauerte.

Die mitgeteilten Befunde geben wieder Anlaß zur Aufstellung der Frage nach der Bedeutung der Jodkomponente bei der künstlichen Auslösung der Metamorphose. Auf Grund der Erfahrungen mit verschiedenen Schilddrüsen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse mit Dijodtyrosin, Dijodtyramin, Jodalbacid ist an der Notwendigkeit eines Jodgehaltes nicht zu zweifeln. Die Thyreoideawirkung auf die Kaulquappen und den Axolotl darf in erster Linie dem jodhaltigen Bestandteil der Schilddrüse zugeschrieben werden[1]). Ob auch bei den zahlreichen anderen Schilddrüsenwirkungen das Jod beteiligt sein muß, ist damit natürlich noch nicht bewiesen. Manche Autoren sprechen direkt von einem Parallelismus zwischen dem Jodgehalt der Schilddrüse und ihrer Wirkung auf die Froschlarven (A. Grahem, Rogoff u. a.). Vielleicht ist in dieser Fassung die Behauptung nicht ganz zutreffend, weil unter pathologischen Bedingungen im Schilddrüsengewebe noch andere Stoffe vorkommen, welche die Wirkung der jodhaltigen Bestandteile verändern können. Auf die Bruchteile von Prozenten an Jod kommt es aber hier weniger an, sondern hauptsächlich auf die Frage: Sind die wirksamen Bestandteile jodhaltig oder jodfrei? Es mag hier noch hingewiesen werden, daß nach neueren Untersuchungen von Wegelin und Abelin[2]) Schilddrüsen von Neugeborenen, die fast durchwegs jodfrei sind, auch beinahe ausnahmslos im Froschlarvenversuch wirkungslos sind. Auch hier erweisen sich Jodgehalt und „Wirksamkeit" aneinander geknüpft. In gleichem Sinne sind auch die Versuche von Rogoff und Marine[3]) zu deuten. Mit Hilfe der

[1]) Neuerdings haben Herzfeld und Klinger (Schweiz. med. Wochenschr. Nr. 27. 1920) auch einen jodfreien Auszug aus der Schilddrüse wirksam gefunden. Es liegt darüber nur eine vorläufige Mitteilung vor; die genauere Diskussion dieser Beobachtung muß daher bis zum Erscheinen der ausführlichen Abhandlung verschoben werden.

[2]) Wegelin und Abelin, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1921.

[3]) M. Rogoff and D. Marine, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. 9. 1916; Collected Papers from the H. K. Cushing Laboratory 5. 1916–17.

Barythydrolyse nach **Kendall** haben **Rogoff** und **Marine** die Schilddrüsenstoffe in drei Fraktionen zerlegt: „A“, „B“ und „Rest“. Fraktionen „B“ und „Rest“ enthielten nur Spuren von Jod und waren im Froschlarvenversuch wirkungslos. Fraktion „A“ enthielt dagegen relativ viel Jod (12 mal mehr als „B“ und ca. 50 mal mehr als „Rest“) und zeigte die typische Metamorphosenbeschleunigung der Kaulquappen.

Die Versuche mit Dijodtyrosin, Dijodtyramin sind noch insofern von einem gewissen Interesse, als es wieder gelungen ist, eine für Schilddrüsenstoffe ganz charakteristische Wirkung — die Metamorphosenbeschleunigung — durch bekannte, einfach gebaute Substanzen zu erzielen.

Zusammenfassung.

1. Für den Eintritt und den Verlauf der Metamorphose der Froschlarven erweisen sich organische Jodverbindungen vom Typus gewisser jodhaltiger Eiweißabbauprodukte von großer Wichtigkeit. Dijodtyrosin, Jodalbacid beeinflussen die Metamorphose der Kaulquappen (Rana esculenta) ganz ähnlich wie die Schilddrüsenstoffe. In gleichem Sinne wirkte in früheren Versuchen Dijodtyramin.

Eine Anzahl anders konstituierter organischer Jodverbindungen (Dijodsalicylsäure, Dijodsalol, Jodopyrin, Kalium sozojodolicum, Dijoddithymol, Jodgallicin) war dagegen wirkungslos.

Neben der Schilddrüse gibt es manche andere Drüsen und neben einigen spezifisch gebauten Jodverbindungen gibt es eine Anzahl von Stoffen, welche zwar entwicklungsbeschleunigend wirken können, welche aber nicht imstande sind, den typischen Symptomenkomplex der Schilddrüsenwirkung zu erzeugen.

2. Die Wirksamkeit des Dijodtyramins, Dijodtyrosins und Jodalbacids ist besonders dann zu berücksichtigen, wenn für die Froschlarvenversuche nicht native Schilddrüsensubstanz, sondern Thyreoideaabbauprodukte oder Thyreoideaextrakte genommen werden.

3. Ebenso wie an Froschlarven ruft Dijodtyrosin auch beim Axolotl Metamorphose hervor. Der Verlauf und das Ergebnis der Umbildung ist dabei ganz ähnlich wie nach Schilddrüsenfütterung.

Erklärung der Abbildungen.

I. Wirkung des Dijodtyrosins.

A. Auf Froschlarven: Abb. 1, N 1; Abb. 2, N 4; Abb. 3, N 6; Abb. 4, N 8; Abb. 6, N 13. Kontrollen dazu: Abb. 1, N 3; Abb. 2, N 5; Abb. 3, N 7; Abb. 4, N 9; Abb. 6, N 14.

B. Auf Axolotl (Versuch 2). Abb. 8. Vor der Eingabe des Dijodtyrosins; Abb. 9. Nach Abschluß der Metamorphose.

(Versuch 1); Abb. 10. Während der Metamorphose; Abb. 11 (kleineres Tier) gegen Schluß der Metamorphose.

II. Wirkung des Jodalbacids. Abb. 1, N 2; Abb. 5, N 12. Kontrollen dazu: Abb. 1, N 3, Abb. 5, N 11.

III. Wirkung der Schilddrüsentabletten.

A. Auf Froschlarven. Abb. 7, N 15.

B. Auf Axolotl. Abb. 12. Vor der Metamorphose; Abb. 11 (größeres Tier). Nach der Metamorphose.

Tyrosin: Abb. 5, N 11. Kalium jodatum: Abb. 7, N 16; Dijodsalizylsäure: Abb. 7, N 17.

Aussehen normal metamorphosierender Kaulquappen (langer Schwanz, sehr gut ausgebildete Extremitäten): Abb. 4, N 10.

Wegen Raummangel konnten die Abb. der mit Jodopyrin, Jodgallicin, Dijodsalol, Kal. sozojodolicum und Aristol behandelten Tiere nicht zum Abdruck gelangen. Die Tiere sehen wie N 17 in Abb. 7 aus.

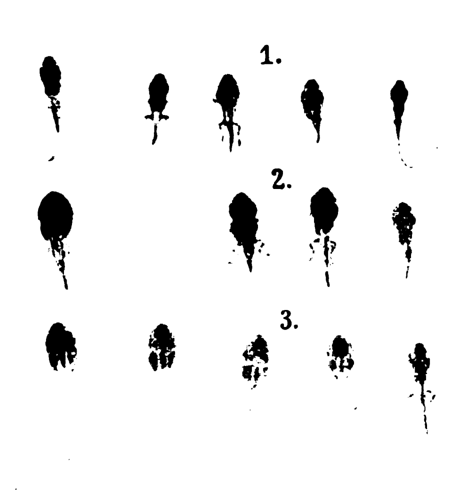


Abb. 1.

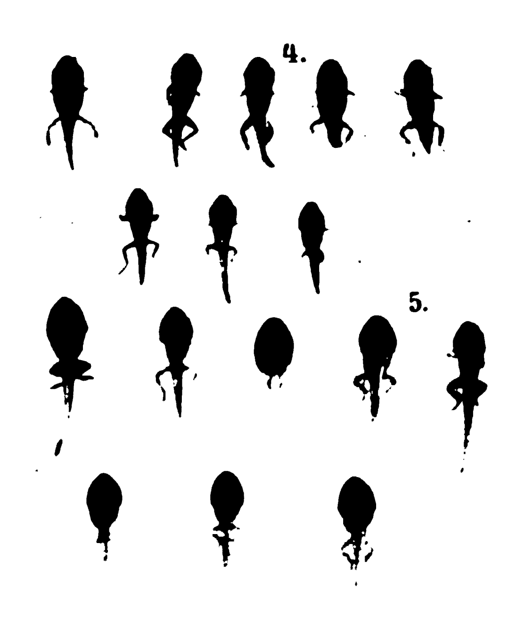


Abb. 2.

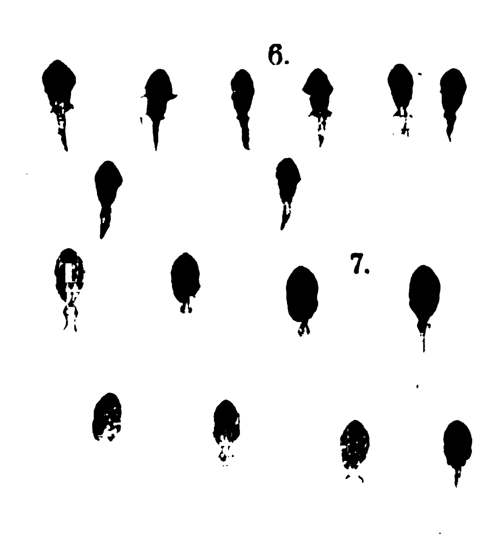


Abb. 3.

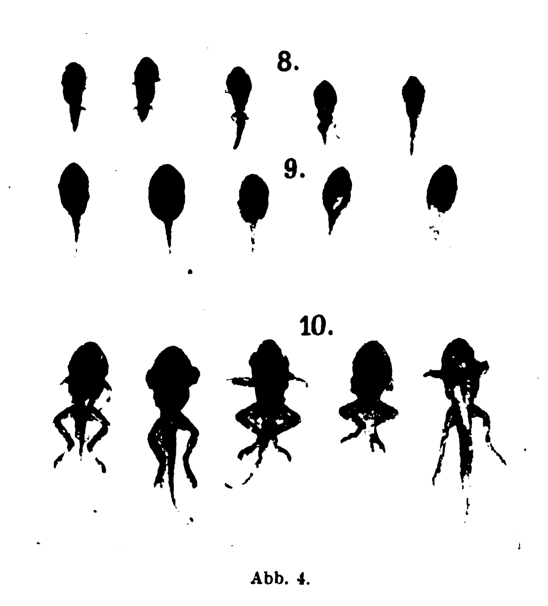


Abb. 4.

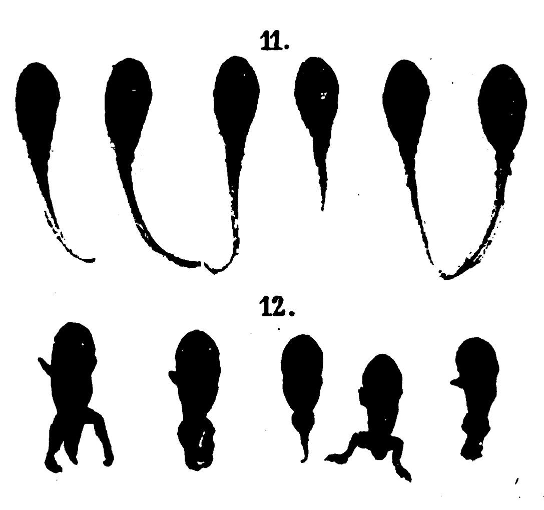


Abb. 5.

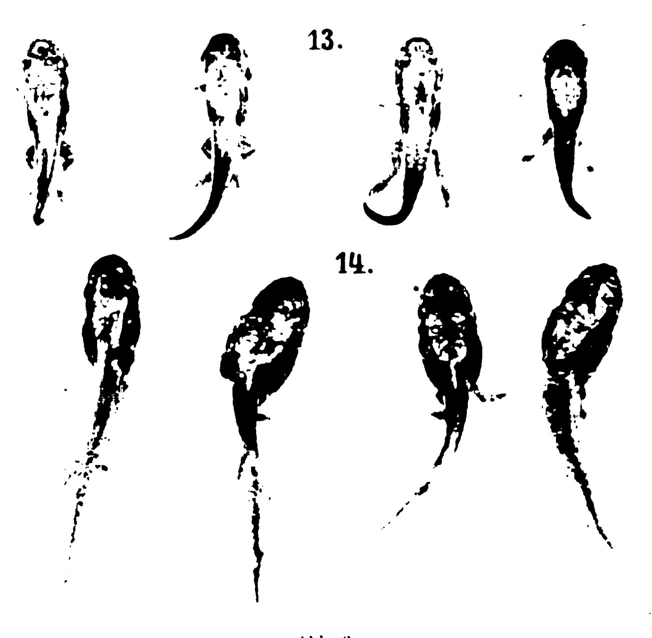


Abb. 6.

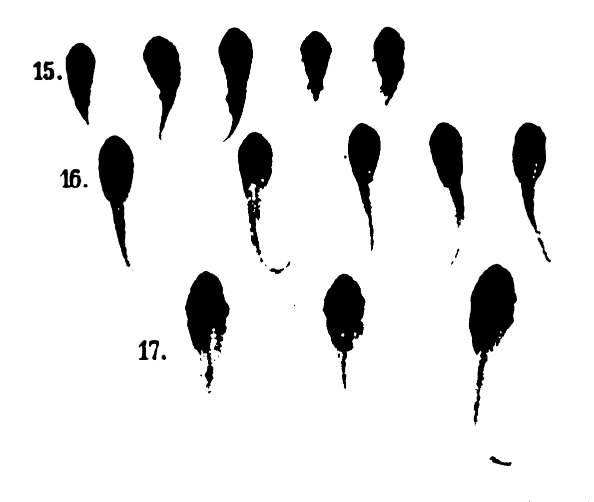


Abb. 7.



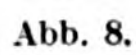


Abb. 8.



Abb. 9.



Abb. 10.



Abb. 11.

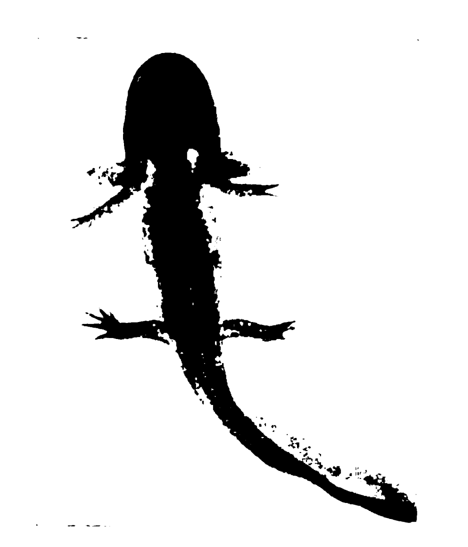


Abb. 12.

Hämolyse und Metallsalze.

Von

N. Waterman.

(Aus dem Laboratorium des Antoni van Leeuwenhoekhuis, Amsterdam.)

(Eingegangen am 25. Januar 1921.)

Angeregt durch die Mitteilungen Bechholds[1]) über „Hämolyse und Blutkörperchenbau", möchte ich über einige Versuche berichten, die mit ganz anderen Zwecken vor ungefähr 1 Jahre von mir gemacht wurden.

Es handelte sich um die Bestimmung des Einflusses von Metallsalzen auf die Ätherhämolyse, deren Mechanismus mir noch wenig geklärt zu sein scheint.

So wie die Untersuchungen Bechholds über Hämolyse unter ultramikroskopischer Beobachtung in Bedeutung über das eigentliche Untersuchungsobjekt weit hinausgehen, handelte es sich bei mir um das Studium zweier Faktoren, Äther (als lipoidlösender Stoff) und Metallsalze, welche beide in der Tumorforschung und Therapie eine gewisse Rolle spielen. Ultramikroskopische Kontrolluntersuchungen vorzunehmen, war ich nicht in der Lage.

Methode.

I.

Kleine Eprouvetten wurden beschickt mit dreimal gewaschenen Blutkörperchen in 10proz. Emulsion (gewöhnlich wurde Pferdeblut benutzt); bisweilen wurde zum Vergleich nur $^1/_{10}$ verdünntes defibriniertes Blut verwendet; das Blut war mit den betreffenden Salzlösungen in absteigender Menge versehen.

Über das Blut wurde nun 1 ccm reinste Äther geschichtet, die Eprouvetten mit Korkstöpseln versehen, und in den Eisschrank gestellt. Nach ungefähr 12 Stunden wurden die Ablesungen ge-

---

[1]) Diese Zeitschr. 109.

macht. Die stattgefundene Hämolyse zeigt sich sehr scharf als roter Ring an der Grenzfläche beider Flüssigkeiten, um so schärfer, als die Blutkörperchen sich inzwischen langsam mehr oder weniger zu Boden gesenkt haben.

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die Wirksamkeit der verschiedenen Salze. Kurz vorweg genommen, stellt sich heraus, daß Zn und Cd noch in Konzentrationen von $^1/_{4000}$—$^1/_{10000}$ hämolysebehindernd wirken, Cu sogar noch in weit schwächeren Verdünnungen, wobei aber eine braungraue Verfärbung zu beobachten ist. In stärkeren Konzentrationen stellt sich selbstverständlich in allen Eprouvetten Ausflockung der Blutkörperchen ein.

Im Gegensatz nun mit diesen Feststellungen zeigen bemerkenswerter Weise die Blutkörperchen mit $HgCl_2$ in ähnlichen Verdünnungen versehen, eine bedeutende Verstärkung der Hämolyse.

Es haben also Ca und Ba gar keine Wirkung in dieser Beziehung, im Gegensatz zu ihrer schützenden Wirkung gegenüber der Hämolyse durch Hypotonie leicht zu bestätigen. Diese Schutzwirkung ist. Parallel geht das Fehlen ausflockender Wirkung. Man ist also zur Annahme gezwungen, daß Ba und Ca in anderer Weise die Blutkörperchensubstanz beeinflussen als die beobachteten Metallsalze, welche nebenbei die Blutkörperchen ihrerseits wohl auch gegen Hämolyse durch Wasser oder hypotonische Lösung schützen[1]).

Die Tabelle bestätigt das schon vorher mitgeteilte: Cu und Zn haben eine eminent schützende Wirkung dem Äther gegenüber, schon bei $^1/_{20000}$fachen Verdünnungen; auch $CdCl_2$ besitzt bei $^1/_{4000}$—$^1/_{10000}$ Verdünnung eine sehr bemerkenswerte schützende Wirkung. Einen auffallenden Gegensatz zeigt nun das Sublimat, das zu einer schützenden Wirkung viel höheren Konzentrationen bedarf. Die Zone von $^1/_{1000}$—$^1/_{10000}$ bewirkt bedeutende Förderung der Ätherhämolyse; nur in noch stärkerer Konzentration tritt eine schützende Wirkung zutage. Diese Zahlen unterscheiden sich in der Größenordnung von denen, welche Bechhold für direkte Hämolyse und fallende Wirkung angibt, wohl ein Hinweis, daß hier keine identischen Prozesse studiert werden. Es sollen in

[1]) Nach Einwirkung höherer Konzentration fällt es bisweilen schwer, überhaupt noch Hämolyse zu erhalten. Zum Wasser zugefügte Salzsäure ruft aber wiederum Hämolyse hervor.

Tabelle I.

1 ccm gewaschenes Pferdeblut $^1/_{10}$, 1 ccm defibriniertes Pferdeblut $^1/_{10}$.

Defibriniertes Pferdeblut $^1/_{10}$ ccm	Resultat (Äther-Hämolyse)	Hinzugefügte Salzlösung ccm	Gewaschen: Pferdeblut $^1/_{10}$ ccm	Resultat (Äther-Hämolyse)	Kontrolle	Bemerkungen
		$CaCl_2$ $^1/_2$%				
1	+	0,02	1	++		
1	+++	0,03	1	++		
1	+	0,05	1	+	+	Keine Flockung
1	+	0,1	1	+		
1	+	0,2	1	+		
1	++	0,5	1	++		
		$BaCl_2$ $^1/_2$%				
1	++	0,02	1	++		Kleine Flockung
1	+	0,03	1	+		
1	+	0,05	1	+	+	
1	+	0,1	1	+		Kein Unterschied in der Hämolysierung
1	++	0,2	1	+		
1	+	0,5	1	+		
		$ZnCl_2$ $^1/_2$% in $^1/_{50}$ NHCl				
1	–	0,02	1	–		Hämolyse aufgehoben
1	–	0,03	1	–		
1	–	0,05	1	–		
1	–	0,1	1	–	+	Starke Flockung
1	–	0,2	1	–		
1	–	0,5	1	–		
		$CuCl_2$ $^1/_2$%				
1	–	0,02	1	–		Hämolyse aufgehoben
1	–	0,03	1	–		
1	–	0,05	1	–	++	
1	–	0,1	1	–		Flockung und Verfärbung
1	–	0,2	1	–		
1	–	0,5	1	–		
		$CdCl_2$ $^1/_2$%				
1	+	0,02	1	–		Beim defibr. Blut Hämolyse nur in den höchsten Termen aufgehoben. Beim gewaschenen Blut keine Hämolyse
1	+	0,03	1	–		
1	(±)	0,05	1	–	+	
1	–	0,1	1	–		
1	–	0,2	1	–		
1	–	0,5	1	–		
		$HgCl_2$ $^1/_2$%				
1	++++	0,02	1	++++		Verstärkte Hämolyse
1	++++	0,03	1	++++		
1	++++	0,05	1	++++		
1	++++	0,1	1	++++	++	Keine Flockung
1	++++	0,2	1	+++		
1	–	0,5	1	–		

aller Kürze noch einige Ergänzungen hinzugefügt werden, namentlich die Wirkung des $CdCl_2$ betreffend, das am meisten studiert wurde. Oberhalb der schützenden Konzentration nämlich stellt sich nicht allein die Behinderung der Ätherhämolyse nicht mehr ein, sondern zeigt sich eine hämolysefördernde Wirkung. Diese Umschlaggrenze ist aber nicht scharf anzugeben, denn sie ist in bedeutendem Maße von dem Alter der Blutkörperchen abhängig, indem sich bei längerem Aufenthalte im Eisschrank eine erhöhte Empfindlichkeit für die Ätherhämolyse bemerkbar macht und bisweilen schon für $CdCl_2$-Konzentrationen von $^1/_{5000}$—$^1/_{10000}$ die schützende Wirkung verloren gegangen und verstärkte Hämolyse an ihre Stelle getreten ist.

Auch liegt die Umschlaggrenze bei verschiedenen Tierarten, wie das zu erwarten war, in Hinsicht auf die anderen schon bekannten Unterschiede in verschiedener Konzentrationsbreite.

II.

Es liegt angesichts dieser Verhältnisse eine Betrachtung der Einwirkung dieser Metallverbindungen auf die Zellipoide sehr nahe. Im Gegensatz nämlich zu dem Sublimat besitzen die Cd-Salze eine ausgesprochene fällende Wirkung auf Lipoide.

Bei daraufhin gerichteten Versuchen konnte dann auch beim Versetzen von Lipoidlösungen mit $CdCl_2$-Lösungen schöne Ausflockungen beobachtet werden, die unter bestimmten quantitativen Verhältnissen durch ein Optimum gehen. Als Lipoidlösungen dienten vornehmlich mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Emulsionen von methylalkoholischem Pankreas- oder Tumor- (Hühner-Sarkom) Extrakt. Es sei zugegeben, daß es sich hier um undefinierte Phosphatidgemische handelt; aber die vielen Handelspräparate dürften doch auch nichts weniger als rein betrachtet werden. Die Flockung wurde aber an einer 2 proz. Agfa-Lecithinemulsion bestätigt, ebenso wie die Lage des Optimums. Die benutzten Pankreas- und Tumorlipoidemulsionen dienten als „Antigene“ bei der Ascolischen Meiostagminreaktion.

Tabelle II zeigt die quantitativen Verhältnisse.

Im Gegensatz also zu dem Sublimat, dessen Wirkungen auf die Blutkörperchensubstanz und ultramikroskopischen Veränderungen als Folge davon, Bechhold und seine Mitarbeiter auf Grund Ausbleibens von Lipoidausflockung ausschließlich ins

Tabelle II.

Verwendete Lipoidemulsion ccm	Resultat	$CdCl_2$-Lösung ccm	Temperatur °C
Methylalkohol. Pankreasextrakt 10 proz. Emulsion		1 proz.	
0,2	++	0,05	20° C
0,2	++	0,1	
0,2	++	0,2	
0,2	(±)	0,3	
0,2	(±)	0,5	
0,2	+++	0,05	50° C
0,2	+++	0,1	
0,2	+++	0,2	
0,2	+	0,3	
0,2	+	0,5	
Idem 5 proz. Emulsion		$^1/_2$ proz.	
1	–	0,01	50° C
1	–	0,02	
1	+	0,05	
1	+++	0,1	
1	++	0,2	
1	++	0,3	
1	+	0,5	
1	+	1	
1	+	2	
Agfa-Lezithin-Emuls. 2 proz.		1 proz.	
+ 0,9 aq. dest. + 1	– Leichte	0,02	37° C
+ 0,85 " " + 1	– Opaleszenz	0,03	
+ 0,85 " " + 1	– "	0,05	
+ 0,8 " " + 1	– "	0,1	
+ 0,8 " " + 1	+	0,2	
+ 0,5 " " + 1	++	0,5	
+ 0 " " + 1	– (Opaleszenz)	1	

Gebiet der Eiweißkörper verlegen, muß m. E. doch bei der Einwirkung der Cd (und Zn)-Salze auch den Lipoidstoffen Rechnung getragen werden. Es wäre auch sehr interessant, das Verhalten dieser Salze ultramikroskopisch zu verfolgen; auch die Beobachtung der Ätherhämolyse allein würde wohl lohnend sein.

III.

An diese Beobachtungen anknüpfend, läßt sich nun noch ein weiterer Versuch ausführen. Die eben erwähnten „Antigene“ sind nämlich stark wirksame Hämolytica; die Pankreasextrakte vor allen hämolysieren gewaschene Blutkörperchen sogar in tausendfachen Verdünnungen; auch das Hühnersarkomextrakt wirkt hämolytisch. Wärme beschleunigt die Hämolyse bedeutend.

Versetzt man nun Blutkörperchenemulsion mit Cd, Zn oder Cu-Lösungen von derselben Größenordnung wie vorher bei den Ätherversuchen beschrieben wurde, fügt „Antigen“-Emulsion hinzu und stellt das Ganze auf das Wasserbad von 37—50° C, dann bleibt ebenfalls die Hämolyse aus. Das gilt aber nur von den höheren Termen, denn bei Hinzufügung sehr verdünnter Salzlösungen zeigt sich wiederum Beschleunigung der Hämolyse. Nachstehende Tabelle gibt einige quantitative Daten.

Tabelle III.

Gewasch. Pferdebl. ccm	1 proz. $CdCl_2$-Lösung ccm	10 proz. „Antigen“-Emuls. ccm	Resultat nach 1/4 Std. 50° C
1	0	0,2	Kompl. Hämolyse
1	0.05	0,2	Spur "
1	0,1	0,2	Keine "
1	0,2	0,2	" "
1	0,5	0,2	" "

Es besteht also eine vollkommene Übereinstimmung zwischen Ätherwirkung und „Antigen“-Affekt, und die Schlußfolgerung, daß beide Substanzen auf dasselbe Substrat einwirken und ähnliche Reaktionen auslösen, dürfte nicht zu gewagt sein.

Vielleicht kann diese kleine Studie zur besseren Erkenntnis der Hämolyse und Blutkörperchenzusammensetzung beitragen, wenn die Resultate bestätigt und auch ultramikroskopisch verfolgt werden. Damit würde vielleicht auch der Tumorforschung genutzt sein, denn, wie schon anfangs gesagt, geht dieses Studium über das eigentliche Objekt, das Blutkörperchen, hinaus.

Das optische Drehungsvermögen der Dextrose unter dem Einfluß von Salzsäure.

II. Mitteilung.

Änderungen des Drehungs- und Reduktionsvermögens von Dextroselösungen in Salzsäure bei 100°.

Von

Hans Murschhauser.

(Aus der akademischen Klinik für Kinderheilkunde in Düsseldorf.)

(Eingegangen am 25. Januar 1921.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Die Vorgänge, die sich bei der Einwirkung von Salzsäure auf Dextrose abspielen, sind abhängig von der Temperatur, von der Säure- und zum Teil auch von der Dextrosekonzentration der Lösungen.

In meiner ersten Abhandlung über diesen Gegenstand[1]) habe ich die Verhältnisse für eine Temperatur von 20,4°, und zwar lediglich in bezug auf das Drehungsvermögen dargelegt.

Ich hatte dabei die von Erdmann bereits 1855 gemachte Beobachtung, daß der Rückgang der Birotation von Dextroselösungen durch Zusatz von Salzsäure beschleunigt würde, in systematischer Weise verfolgt und damit den Konzentrationsbereich für die Säure fixiert, innerhalb dessen der Mutarotationsverlauf von Dextrose für uns meßbar zu verfolgen ist. Es ergab sich, daß 0,005 proz. Salzsäure eine eben noch nachweisbare Beschleunigung des Rotationsrückganges gegenüber wässerigen Lösungen bewirkt, während von 7 proz. Säure ab der Vorgang mit solcher Geschwindigkeit sich vollzog, daß er innerhalb der zum Lösen usw. benötigten Zeit von 5 Minuten bereits abgeschlossen war.

---

[1]) Diese Zeitschr. 104, 214. 1920.

Bei dieser Gelegenheit stellte ich ferner fest, daß Lösungen von Dextrose in kalter Salzsäure nach Ablauf der Mutarotationsperiode Drehungen aufweisen, die sich mit der aus wässerigen Lösungen berechneten spezifischen Drehung für die Dextrose nicht deckten. Die Enddrehung war bei Lösungen bis zu einem Gehalt von 2% Salzsäure normal, von hier ab stellte sich eine mit der Säurekonzentration ansteigende Erhöhung des Endwertes ein.

Diese Werte für die Enddrehung bleiben, falls die Konzentration an Säure und Dextrose gering ist, für längere Zeit konstant. Dagegen treten in Lösungen höherer Säure- und Dextrosekonzentrationen nachträglich Steigerungen des Endwertes ein; bei den höchsten Konzentrationen folgt dieser anfänglichen Zunahme des Endwertes ein alsbald einsetzender, dauernd fortschreitender Rückgang der Drehung, der durch die Zuckerzersetzung bedingt ist.

Sämtliche Reaktionen sind in ihrem Geschwindigkeitsverlauf ceteris paribus von der Säurekonzentration der Lösung abhängig.

Die unter dem Einfluß starker Salzsäure auf Dextrose bei Zimmertemperatur nachträglich auftretende Erhöhung der Drehung führte E. Fischer[1]) auf die teilweise Synthese einer Glucobiose zurück, die er wegen des analogen Verhaltens ihres Osazons mit der Maltose als Isomaltose bezeichnet hat. E. Fischer hatte sie gewonnen, indem er 100 g Glucose in 400 ccm Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) löste und die Lösung 15 Stunden bei 10—15° aufbewahrte.

Bei Anwendung niedrigerer Dextrose- und Säurekonzentrationen ist die Entstehung von Isomaltose mindestens zweifelhaft. Trotzdem wird sie von verschiedenen Seiten angenommen und die unter bestimmten Verhältnissen beobachtete Konstanz der Drehung von Dextrose in konzentrierter Salzsäure als eine scheinbare bezeichnet und darauf zurückgeführt, daß die zweifellos vorhandene Zunahme der Drehung durch eine allmähliche, an der sich langsam entwickelnden Gelbfärbung zu erkennenden Zerstörung von Dextrose ausgeglichen wird[2]).

Die Entstehung von Isomaltose in dextrosearmen Lösungen bei Zimmertemperatur ist vorläufig hypothetisch.

Dagegen liegt die Möglichkeit nicht allzufern, daß, wenn starke Salzsäure in konzentrierten Dextroselösungen die Bildung einer

[1]) E. Fischer, B. **23**, 3687. 1890; **28**, **30**, 24. 1895.
[2]) John Daish, Journ. Chem. Soc. **105**, 2053.

Glucobiose schon in der Kälte veranlaßt, derselbe Effekt in Lösungen geringerer Dextrose- und Säurekonzentrationen, in denen bei gewöhnlicher Temperatur keine Einwirkung stattfindet, bei höheren Temperaturen ausgelöst würde.

Über das Verhalten von Dextrose gegen Salzsäure in der Wärme ist noch wenig bekannt. Kubler[1]) fand, daß beim Kochen von 1 g Dextrose mit 5 proz. alkoholischer Salzsäure in 12 Stunden 32,35—48,14%, mit wässeriger 5 proz. Säure 5,07—5,63% des Zuckers in derselben Zeit zerstört würden.

Als Produkte der Einwirkung von Salzsäure auf Dextrose bei 75° entsteht nach Harrison[2]) zunächst Isomaltose. Diese erleidet eine weitere Umwandlung; neben huminartigen Bestandteilen werden Ameisensäure und Lävulinsäure gebildet, also dieselben Stoffe, die unter denselben Verhältnissen, nur bedeutend schneller, aus Lävulose entstehen.

In der vorliegenden Arbeit[3]) sollte ermittelt werden, ob und in welchem Grade sich Drehung und Reduktionsvermögen von Dextrose unter dem Einfluß von Salzsäure bei 100° ändern, und welche Rolle hierbei die Säure- und Dextrosekonzentration spielen.

Die Untersuchung wurde, worauf ich in meiner ersten Mitteilung bereits hingewiesen, in der Absicht ausgeführt, festzustellen, ob sich aus dem Verhalten der Dextrose gegen Salzsäure bei der Temperatur des kochenden Wassers Perspektiven für die Verwendung der Salzsäuremethode zur quantitativen Bestimmung von Dextrose und Lävulose nebeneinander eröffneten. Um klarer zu sehen, habe ich die Lösungen nach wechselnder Erhitzungsdauer gleichzeitig auf ihr Drehungs- und Reduktionsvermögen untersucht.

Die Beantwortung der vorliegenden Frage schließt die Lösung einer weiteren in sich ein, nämlich der nach der Bildung von Isomaltose aus Dextrose in Lösungen niedrigerer Säurekonzentrationen bei höheren Temperaturen.

Da die Isomaltose eine spezifische Drehung von $\alpha_D = +140°$ aufweist, also nahezu das dreifache derjenigen der Dextrose, und andererseits Fehlingsche Lösung schwächer reduziert als die

---

[1]) Arch. de pharmacol. **246**, 620. 1908.

[2]) Journ. of the Amer. chem. soc. **36**, 586.

[3]) Die Versuche wurden gemeinschaftlich mit H. Nopper, H. Wolfers und H. Schürmann ausgeführt.

Monose, so muß sich ihre Entstehung schon durch die Zunahme des Drehungsvermögens und Verminderung des Reduktionsvermögens der Lösung dokumentieren.

Da ich nach meinen bisherigen Erfahrungen die Überzeugung gewonnen, daß die Dextrosekonzentration nicht ohne Einfluß auf das Resultat sein würde, habe ich dieselbe weitgehend variiert. In der Wahl der Salzsäurekonzentrationen ließ ich mich von den Ergebnissen meiner früheren Untersuchungen in der Kälte leiten. Da von der Einwirkung in der Wärme ein erhöhter Effekt zu erwarten war, durfte die Salzsäurekonzentration nicht so hoch genommen werden, daß schon in der Kälte eine Erhöhung der Drehung oder gar eine Zerstörung von Dextrose eintreten konnte; andererseits aber wollte ich mit der Konzentration nicht zu tief gehen. Die gewählten Säurekonzentrationen waren 5,1, 8,1 und 10,1%.

Experimenteller Teil und Ergebnis.

Zur Einführung in die von mir angewandte Methodik sei an dem Beispiel einer 19,45 proz. Dextroselösung in 5,1 proz. Salzsäure der Gang der Arbeitsweise kurz beschrieben.

Die Dextrose, die ich zu den Versuchen verwendete, stammte von E. Merck und war ein „Purissimum, wasserfrei"-Präparat. Für die Ausführung der vorliegenden Versuche spielt der geringe, wechselnde Wassergehalt keine Rolle, da der Drehungs- und Reduktionswert in jedem Falle vorher bestimmt worden war.

Die für eine Versuchsserie mit bestimmtem Dextrose- und Säuregehalt benötigte Lösung wurde in einer Portion bereitet und dieser bestimmte, gleiche Volumina für jede Einzeluntersuchung entnommen. Zur Herstellung obiger Lösung wurden 100 g Dextrose zu 500 ccm 5,1 proz. Salzsäure gelöst. Die Polarisation der Lösung erfolgte frühestens 1 Stunde später.

Um die Ablesungen am Polarisationsapparat auf Normalverhältnisse (d. h. auf wässerige Lösung) umrechnen zu können, mußte ich den Einfluß der Säure auf die Drehung für jede Konzentration bestimmen. Das geschah durch den Vergleich des Drehungswertes der betreffenden salzsauren Lösung mit dem der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt (nach 24 Stunden).

Von der so bereiteten Lösung dienten je 50 ccm zum Erhitzungsversuch. Zur Ausführung derselben wurde der mit der Lösung beschickte Kolben nach erfolgtem Wägen in ein kochendes

Wasserbad versenkt und am Rückflußkühler bis zum Ablauf einer bestimmten Frist erhitzt. Über die Erhitzungsdauer belehrt uns die Tabelle. Nach dem Erhitzen wurde rasch abgekühlt, etwaige Gewichtsverluste durch Wasser ergänzt.

Da die Lösungen nach dem Erhitzen mehr oder minder stark gefärbt waren, konnte die Ablesung im Polarisationsapparat erst nach Aufhellung mit Kohle erfolgen. Der adsorbierende Einfluß einer bestimmten Menge Kohle auf die Drehung wurde durch einen Kontrollversuch an der farblosen Ausgangslösung ermittelt und bei der Umrechnung auf Normalverhältnisse berücksichtigt.

Die in den Tabellen unter der Rubrik „Drehung korrigiert" aufgeführten Zahlen geben uns die Drehungswerte an, wie wir sie bei der Polarisation einer wässerigen Lösung ohne Anwendung von Kohle erhalten haben würden. Aus ihnen ist die prozentuale Änderung der Anfangsdrehung (diese ebenfalls auf Wasser bezogen) berechnet.

Das Drehungsvermögen wurde in einem Halbschattenapparate nach Schmidt und Haensch bestimmt; die Länge des verwendeten Polarisationsrohres betrug 189,4 mm. Auf Grund dieser Angabe konnte die Umrechnung auf spezifische Drehung unterbleiben. Als Beleuchtungsquelle diente das Chlornatriumlicht.

Zur Bestimmung des Reduktionsvermögens wurden 20 ccm der sauren Zuckerlösung mit Natrionlauge neutralisiert und auf 200,0 ccm mit destilliertem Wasser ergänzt. 10 ccm der Verdünnung dienten zur Bestimmung des Reduktionsvermögens. Bei dextroseärmeren Lösungen wurden die Verdünnungsverhältnisse entsprechend variiert. Die Bestimmung selbst erfolgte nach E. Pflüger. Das gewogene Kupferoxydul wurde als Dextrose in Rechnung gebracht. Die letzte Rubrik der nachfolgenden Tabellen zeigt die prozentualen Verluste der Lösungen an Reduktionskraft nach den verschiedenen Erhitzungszeiten.

Wir stellen zunächst die bereits bekannte Tatsache fest, daß die nicht erhitzte Lösung von Dextrose in 5,1 proz. Salzsäure eine stärkere Rechtsdrehung aufweist, als die wässerige Lösung von demselben Zuckergehalt. Bei den salzsäurereicheren Lösungen sind die Unterschiede wesentlich größer.

Wird die salzsäurehaltige Dextroselösung auf 100° erhitzt, so tritt alsbald eine Verstärkung der Rechtsdrehung ein. Dieselbe beträgt nach 15 Minuten bereits 3, nach 30 Minuten 4,5% des

Tabelle I.

Dextrose in 5,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 19,45°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung 19,45% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	19,50	19,45	—	—
1/4 Std.	20,10	20,05	+3,00	— 4,98
1/2 „	20,35—20,40	20,30—20,35	+4,37 bis +4,62	— 5,70
1 „	20,50	20,45	+ 5,14	— 7,45
3 „	20,10	20,05	+3,08	— 9,25
6 „	19,30	19,25	—1,02	—12,49
5 „ 15 Min.	19,45—19,50	19,40—19,45	—0,25 bis +0,00	—12,19

*) Der Einfluß des Adsorptionsvermögens der Kohle auf die Drehung ist in diesen Zahlen bereits eliminiert.

**) Der in Kontrollversuchen eruierte Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung der Dextroselösung ist eliminiert.

ursprünglichen Drehungswertes. Nach etwa 1 Stunde ist der Gipfel der Steigerung erreicht. Von hier ab geht die Drehung zurück; sie steht nach 3stündiger Erhitzungsdauer noch **über**, nach 6stündiger **unter** dem Werte der Ausgangsdrehung.

Im Gegensatz hierzu sinkt das Reduktionsvermögen der Lösung vom Beginn des Erhitzens an dauernd ab. Der Rückgang ist anfänglich viel stärker als in späteren Zeitabschnitten. Die Verluste betragen nach 15 Minuten bereits 5, nach 6stündigem Erhitzen 12,49% des Reduktionswertes der ursprünglichen Lösung.

Wir begegnen hier der interessanten Erscheinung, daß beim Erhitzen einer Lösung von Dextrose in Salzsäure unter gewissen Versuchsbedingungen das Drehungsvermögen zunimmt, während das Reduktionsvermögen gleichzeitig eine bedeutende Abnahme erfährt.

Es ist oben darauf hingewiesen worden, daß die beim Aufbewahren konzentrierter Dextroselösungen in kalter, konzentrierter Salzsäure auftretende Drehungszunahme durch die Bildung einer Glucobiose erklärt wurde. Aus der experimentell ermittelten Kombination von Erscheinungen, einer Drehungszunahme bei gleichzeitiger Abnahme des Reduktionsvermögens müssen wir

den Schluß ziehen, daß die Einwirkung von Salzsäure geringerer Konzentrationen auf Dextrose in der Hitze zur Bildung derselben Stoffe führt, die in konzentrierten Dextroselösungen in starker Salzsäure schon bei Zimmertemperatur entstehen.

Es findet also in demselben Milieu, in dem man sonst die Zerstückelung komplizierter Kohlenhydratkomplexe vornimmt, die Synthese eines größeren Zuckermoleküls aus einer Monose statt. Ob dabei eine Biose oder Polyose entsteht, mag vorläufig unbesprochen bleiben; vielleicht liegt auch hier, wie bei der Einwirkung in der Kälte von verschiedenen Seiten angenommen wird, ein Gemisch beider vor.

Die bloße Annahme der Entstehung von Biose oder Polyose vermag allerdings das prozentuale Verhältnis zwischen den Änderungen des Drehungs- und Reduktionsvermögens nicht zu erklären. Denn versucht man rechnerisch die Menge der entstandenen Isomaltose aus dem Drehungszuwachs zu ermitteln, so bemerkt man alsbald, daß die anfängliche Abnahme des Reduktionsvermögens mit der Zunahme des Drehungsvermögens nicht Schritt hält.

Als Beispiel diene der einstündige Erhitzungsversuch der Lösung von 20% Dextrose in 5,1 proz. Salzsäure. Nach dem spezifischen Drehungsvermögen der Isomaltose berechnen wir, daß das Plus von 5,1% an Drehung einer Bildung von genau 3 g Isomaltose entspricht. Angenommen nun, daß das Reduktionsvermögen der Isomaltose ebensogroß wäre wie das der Dextrose, so ist die Verminderung um 3% immer noch viel zu gering im Vergleich mit der experimentell gefundenen von 7,45%.

In der Tat geht ja neben der Dextroseumwandlung eine Zuckerzerstörung einher, die mit der Isomaltosebildung zusammen die verstärkte Verminderung des Reduktionsvermögens bedingt.

Nach den bisher gewonnenen Zahlen wurde versucht, diejenige Erhitzungsdauer zu errechnen, die zur Erzielung des Drehungswertes der nicht erhitzten Ausgangslösung benötigt würde. Wie aus der letzten Horizontalreihe der Tabelle I ersichtlich, ist diese mit 5 Stunden 15 Minuten genau getroffen worden. Während also die Reduktionskraft der Urlösung innerhalb dieser Zeit um 12,2% heruntergegangen ist, decken sich die Werte für die absolute Drehung vollständig.

Man möchte geneigt sein, aus diesem Verhalten der Dextrose den Schluß zu ziehen, daß die optischen Erscheinungen mehr Aussichten böten für die Schaffung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Dextrose und Lävulose nebeneinander auf Grund ihres Verhaltens gegen Salzsäure als das Reduktionsvermögen.

In der oben geschilderten Weise wurden des ferneren Lösungen von 19,45% Dextrose in 8,06 und 10,1 proz. Salzsäure bereitet und auf ihr Verhalten beim Erhitzen untersucht. Das Ergebnis findet sich in den Tabellen II und III.

Tabelle II.

Dextrose in 8,06 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 19,45°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung 19,45% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	19,65	19,45	—	—
1/4 Std.	20,65	20,45	+5,14	— 6,68
1/2 "	20,75—20,80	20,55—20,60	+5,65 bis +5,91	— 6,58
1 "	20,50	20,30	+4,37	— 9,04
2 "	19,90	19,70	+1,28	—11,46
3 "	19,45—19,50	19,25—19,30	—1.02 bis —0,77	—13,00
6 "	18,00	17,80	—8,48	—19,22
2 " 33 Min.	19,80	19,60	+0,77	—12,08

*) Der Einfluß des Adsorptionsvermögens der Kohle auf die Drehung ist in dieser Zahlenreihe bereits eliminiert.
**) Der Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Tabelle III.

Dextrose in 10,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 19,45°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung = 19,42% Traubenzucker.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	19,75	19,45	—	—
1/4 Std.	20,85	20,55	+ 5,65	— 8,02
1/2 "	20,80—20,85	20,50—20,55	+ 5,39 bis +5,65	— 8,38
1 "	20,45	20,15	+ 3,84	— 10,59
2 "	19,85	19,55	+ 0,51	— 12,95
2 1/2 "	19,20	18,90	— 2,82	— 15,42
3 "	19,00	18,70	— 3,85	— 15,26
6 "	16,60	16,30	—16,19	— 25,1

*) Korrektur für den Einfluß der Kohle ist erfolgt.
**) Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Bei den höheren Säurekonzentrationen (8,06 und 10,1%) wiederholen sich im großen und ganzen die Erscheinungen, die wir bei der 5,1 proz. Salzsäure kennen gelernt haben. Die Unterschiede, die hierbei auftreten, sind zeitliche. Bei allen Säurekonzentrationen steigt die Drehung zunächst an, um dann dauernd abzunehmen. Während aber der Gipfel, dessen Höhe durch die Säurekonzentration nicht beeinflußt wird, bei der 5 proz. Säure nach ca. 1 Stunde gewonnen wird, ist er bei der 8,1 proz. nach 30, bei der 10,1 proz. Säure schon nach 15 Minuten erreicht. Vom Gipfelpunkt geht die Drehung alsdann um so rascher zurück, je höher der Säuregehalt der Lösung ist; mit anderen Worten: Die Kurven für den Drehungsverlauf steigen und fallen um so steiler, je höher die Säurekonzentration der Lösung ist.

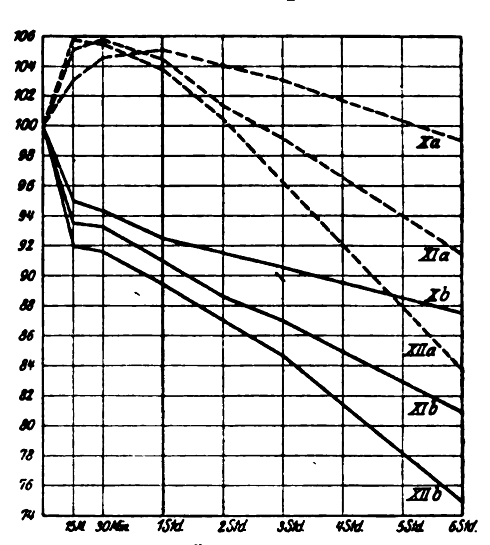


Abb. 1. Prozentuale Änderung des Drehungs- und Reduktionsvermögens einer 19,45 proz. Dextroselösung in
X. 5,1 proz. Salzsäure bei 100°.
XI. 8,1 „ „ „ „
XII. 10,1 „ „ „ „
a) Drehungskurven. b) Reduktionskurven.

Wie bei der 5,1 proz. Salzsäure sinkt auch bei der 8,1 und 10 proz. das Reduktionsvermögen der Dextroselösung vom Beginn des Erhitzens. Die prozentuale Abnahme desselben ist um so stärker, je höher die Säurekonzentration ist. Sie beträgt beispielsweise nach 6 stündiger Erhitzungsdauer bei Verwendung von

5,1 proz. Säure 12,5%,
bei 8,1 proz. Säure 19,2%,
bei 10,1 proz. Säure 25,1%

der Reduktionskraft der Ausgangslösung.

Die weiteren Erhitzungsversuche wurden mit Lösungen angestellt, die ca. 10% Dextrose in 5,1—8,1 und 10,1 proz. Salzsäure enthielten. Die Ergebnisse finden sich in den Tabellen IV, V und VI.

Tabelle IV. Dextrose in 5,1proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,75°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	9,85	9,75	—	—
1 Std.	9,95	9,85	+ 1,03	− 4,1
3 "	9,80	9,70	− 0,5	− 5,3
6 "	9,35	9,25	− 5,1	−10,5
12 "	8,80	8,70	−10,7	−15,4

Versuchsreihe II.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,95°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	10,05	9,95	—	—
1/4 Std.	10,10—10,15	10,00—10,05	+ 0,5 bis + 1,0	− 4,5
1/2 "	10,20	10,10	+ 1,5	− 4,3
1 "	10,20	10,10	+ 1,5	− 5,3
1 "	10,20	10,10	+ 1,5	− 5,6
3 "	10,05—10,10	9,95—10,00	0 bis + 0,5	− 5,9

*) Der Einfluß des Adsorptionsvermögens der Kohle auf die Drehung ist hierbei bereits eliminiert.

**) d. h. der in Kontrollversuchen eruierte Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung der Dextrose ist hierbei eliminiert.

Tabelle V. Dextrose in 8,1proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,70°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	9,90	9,70	—	—
1/2 Stunde	10,10	9,90	+ 2,06	− 3,7
1 "	10,00	9,80	+ 1,03	− 8,7
3 Stunden	9,55—9,60	9,35—9,40	− 3,6	− 8,4
6 "	8,80	8,60	−11,3	−15,2
12 "	7,65	7,45	−23,2	−25,9

Versuchsreihe II.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,95°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	10,15	9,95	—	—
1/2 Stunde	10,25	10,05	+ 1,0	− 5,4
1 "	10,20	10,00	+ 0,5	− 6,2
1 "	10,20	10,00	+ 0,5	− 6,2
3 Stunden	9,75	9,55	− 4,0	−10,2

*) Der Einfluß des Adsorptionsvermögens von Kohle auf die Drehung ist in diesen Zahlen eliminiert.

**) Der in Kontrollversuchen ermittelte Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung ist hierbei eliminiert.

Tabelle VI.

Dextrose in 10,2 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,10°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	9,35	9,10	—	—
1 Stunde	9,20	8,95	− 1,6	− 4,3
6 Stunden	7,40	7,15	−21,4	−21,1
12 „	5,90	5,65	−37,9	−35,3

Versuchsreihe II.

Drehung der wässerigen Lösung nach 24 Stunden = 9,95°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung d. Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	10,20	9,95	—	—
1/2 Stunde	10,35	10,10	+ 1,5	− 4,7
1 „	10,10—10,15	9,85—9,90	− 1,0 bis −0,5	− 6,4
1 „	10,10	9,85	− 1,0	− 7,0
3 Stunden	9,50	9,25	− 7,1	−12,3

*) Einfluß von Kohle auf die Drehung eliminiert.
**) Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung eliminiert.

Die Tabellen und die daraus konstruierten Kurven der Abb. 2 bieten ein ähnliches Bild wie die der 20 proz. Dextroselösungen.

Bei der Lösung mit 5,1 proz. Salzsäure tritt zunächst wiederum ein Anstieg des Drehungsvermögens auf, das sich während der zweiten halben Stunde konstant erhält, um dann eben so flach, und zwar annähernd parallel mit der korrespondierenden Lösung der ersten Versuchsreihe abzufallen.

Die Drehung der Dextroselösung mit 8,1 proz. Salzsäure erreicht denselben Gipfel wie die 5,1 proz., fällt aber dann früher und etwas steiler, aber wiederum parallel mit der korrespondierenden Lösung der vorigen Versuchsreihe ab; noch steiler wird der Abfall bei der 10 proz. Säure.

Die Kurvenbilder beider Versuchsreihen (mit 20 und 10% Dextrose) weisen denselben Charakter auf; die Unterschiede zwischen beiden sind quantitative.

Die Punkte für die Drehung der 20 proz. Lösungen liegen auf der ganzen Strecke höher als die entsprechenden der 10 proz. Die Erscheinung ist mit dem anfänglich stärkeren Anstieg (d. h. reichlicherer Isomaltosebildung) bei den 20% Dextrose enthaltenden Lösungen in Zusammenhang zu bringen.

Damit steht in voller Harmonie die Tatsache, daß die prozentuale Abnahme des Reduktionsvermögens bei den 20 proz. Lösungen durchweg größer ist als bei den analogen Lösungen mit 10% Dextrose. Es mag dahingestellt sein, ob diese Annahme allein die Unterschiede in der Verringerung des Reduktionsvermögens bei den beiden Versuchsserien zu erklären vermag. Im übrigen

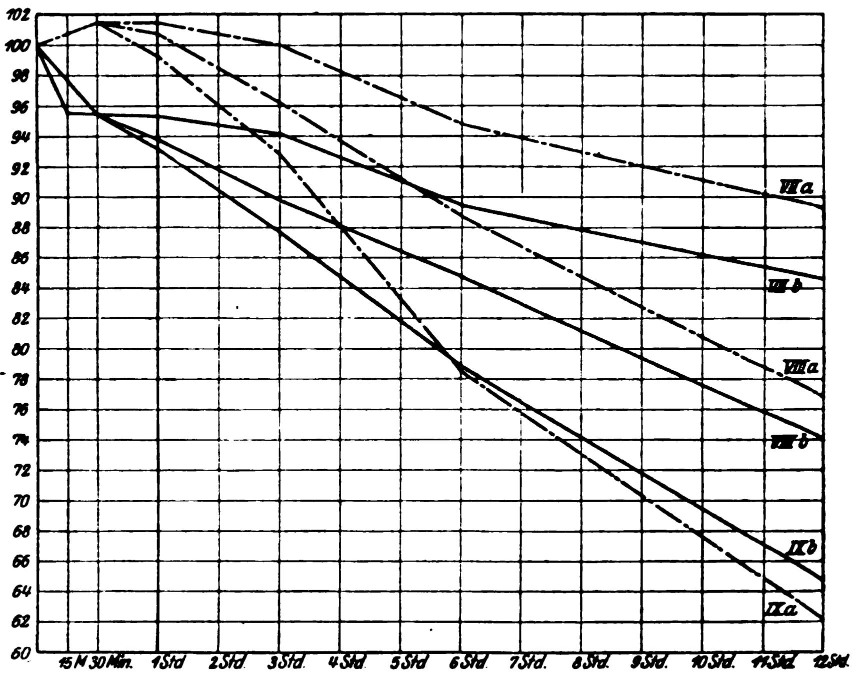


Abb. 2. Prozentuale Änderung des Drehungs- und Reduktionsvermögens einer ca. 10 proz. Dextroselösung in

VII. 5,1 proz. Salzsäure bei 100°.
VIII. 8,1 „ „ „ „
IX. 10,1 „ „ „ „

a) Drehungskurven. b) Reduktionskurven.

gilt für die 10 proz. Dextroselösungen das gleiche, was von den 20 proz. gesagt ist: Die Verminderung der Reduktionskraft hebt mit dem Beginn des Erhitzens an, verläuft von der 2. Stunde ab nahezu geradlinig mit der Erhitzungsdauer und nahezu parallel mit den analogen Kurven der 20 proz. Lösungen.

Die Drehungs- und Reduktionsverhältnisse wurden ferner an Lösungen studiert, die ca. 5 bzw. 2,25% Dextrose in 5,1, 8,1 und 10,1 proz. Salzsäure enthielten.

Tabelle VII.

Dextrose in 5,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt = 4,50°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung = 4,52% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung*) in °	Drehung korrigiert**) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	4,60	4,50	—	—
1 Stunde	4,50	4,40	— 2,20	— 3,45
3 Stunden	4,45	4,35	— 3,2	— 3,66
6 "	4,35	4,25	— 5,5	— 7,5
12 "	4,05	3,95	—12,2	—13,5

Versuchsreihe II.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt = 5,00°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung = 5,00% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung*) in °	Drehung korrigiert**) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	5,05	5,00	—	—
1/2 Stunde	5,05	5,00	± 0,0	— 1,4
1/2 "	5,05	5,00	± 0,0	— 1,2
1 "	5,00	4,95	— 1,0	— 2,4
1 "	5,00	4,95	— 1,0	— 2,6
1 "	5,00	4,95	— 1,0	— 2,4
3 Stunden	4,90	4,85	— 3,0	— 3,8
6 "	4,70	4,65	— 7,0	— 7,4

*) Der Einfluß des Adsorptionsvermögens der Kohle auf die Drehung ist in dieser Zahlenreihe eliminiert.

**) Der Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Tabelle VIII.

Dextrose in 8,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt nach 24 Stunden = 5,00°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung = 5,00% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung in °	Drehung korrigiert**) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	5,10	5,00	—	—
1/2 Stunde	5,05	4,95	— 1,0	— 2,2
1/2 "	5,05	4,95	— 1,0	— 1,8
1 "	5,00	4,90	— 2,0	— 3,6
1 "	5,00	4,90	— 2,0	— 3,0
3 Stunden	4,70	4,60	— 8,0	— 8,0
6 "	4,45	4,35	—13,0	—12,2
12 "	3,90	3,80	—24,0	—24,2

*) Der Einfluß der Kohle auf die Drehung ist berücksichtigt.

**) Der Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung der Lösungen ist eliminiert.

Tabelle IX.

Dextrose in 10,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt nach 24 Stunden = 4,65°. Nach dem Reduktionsvermögen enthält die Lösung = 4,65% Dextrose.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung*) in °	Drehung korrigiert**) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	4,80	4,65	—	—
3 Stunden	4,35	4,20	− 9,6	− 11,1
6 „	3,95	3,80	− 18,3	− 19,9
12 „	3,15	3,00	− 35,5	− 33,6
II. Versuchsreihe. Die Lösung enthält 5,00% Dextrose.				
Vor dem Erhitzen	5,15	5,00	—	—
1/2 Stunde	5,05	4,90	− 2,0	− 3,0
1 „	5,00	4,85	− 3,0	− 5,0
3 Stunden	4,55	4,40	− 12,0	− 11,6
6 „	4,05	3,90	− 22,0	− 21,8
III. Versuchsreihe. Die Lösung enthält nach dem Reduktionsvermögen = 5,00% Dextrose.				
Vor dem Erhitzen	5,15	5,00	—	—
1/2 Stunde	5,05	4,90	− 2,0	− 3,0
1 „	5,00	4,85	− 3,0	− 4,8
6 Stunden	4,10	3,95	− 21,0	− 20,6

*) Der Einfluß der Kohle auf die Drehung der Lösung ist hierbei eliminiert.

**) Der Einfluß von Kohle und Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Wenn man die Zahlen für die Änderung der Drehung beim Erhitzen der Lösungen dieser Versuchsreihe (ca. 5% Dextrose) in ein Koordinatensystem einträgt, so erhält man nahezu gerade Linien. Wie bei den beiden vorausgehenden Versuchsreihen fällt die Gerade bei der schwächsten Säurekonzentration am flachsten, bei der höchsten am steilsten ab. Da eine Änderung des Drehungsvermögens im positiven Sinne bei keiner der angewandten Konzentrationen und Erhitzungszeiten auftrat, so könnte man geneigt sein, in diesem Falle die Isomaltosebildung zu negieren. Eine genauere Betrachtung der Zahlen wie der Kurvenbilder führt jedoch zu der Überzeugung, daß auch bei dieser Dextrosekonzentration noch eine, wenn auch ganz schwache Bildung von Isomaltose vorliegen muß. Die Drehung der Lösung in 5,1 proz. Salz-

säure bleibt beim halbstündigen Erhitzen bestehen, während das Reduktionsvermögen um 1,4% zurückgeht, und die Winkel, welche die beiden anderen Linien (8 und 10% HCl) mit der Horizontalen bilden, sind bis zum Ablauf der ersten Stunde spitzer als in ihrem späteren Verlauf.

Bezüglich der Abnahme des Reduktionsvermögens mit der Erhitzungsdauer gilt dasselbe, was über die 10proz. Lösungen

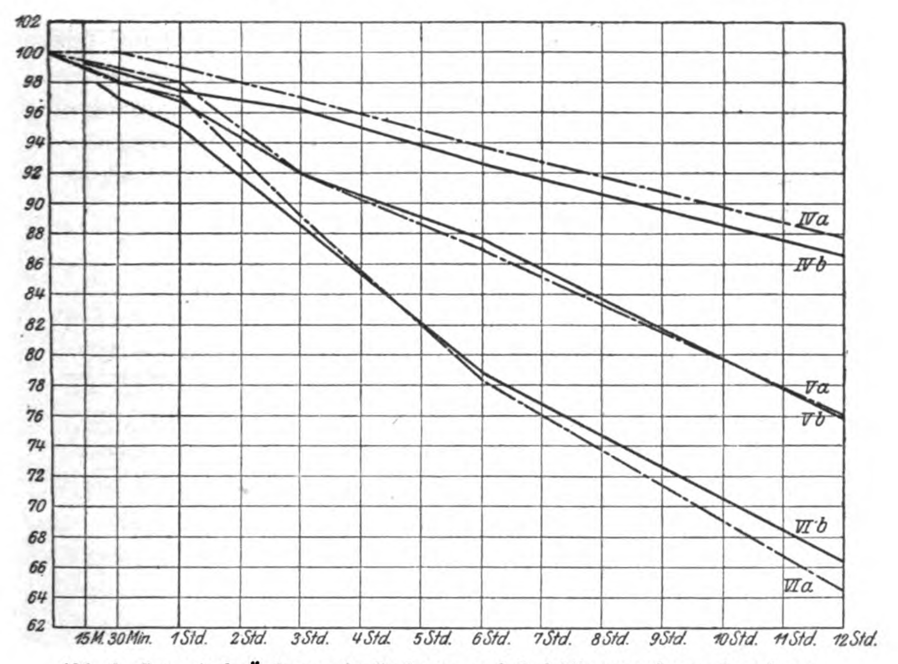


Abb. 3. Prozentuale Änderung des Drehungs- und Reduktionsvermögens einer 5proz. Dextroselösung in
IV. 5,1 proz. Salzsäure bei 100°.
V. 8,1 „ „ „ „
VI. 10,1 „ „ „ „
a) Drehungskurven. b) Reduktionskurven.

gesagt worden ist. Die Abnahme beginnt mit dem Erhitzen, und ihr Verlauf mit der Erhitzungsdauer folgt nahezu einer Geraden.

Auch hinsichtlich der relativen Beziehungen zwischen den 5 und 10proz. Lösungen gilt dasselbe, was zwischen der 20 und 10% Dextrose enthaltenden Lösungen zu konstatieren war. Der Rückgang des Reduktionsvermögens war bei den 20proz. in allen Punkten relativ stärker als bei den 10proz.; er ist bei den 10proz. stärker als bei den 5proz. Lösungen.

Die allmähliche Verminderung der Isomaltosebildung mit der Verringerung der Dextrosekonzentration und die dadurch bedingte Umformung der bei den höheren Dextrosekonzentrationen anfänglich stark gekrümmten Drehungskurven zu Geraden einerseits, die mit der Verminderung der Dextrosekonzentration einhergehende Verflachung der Kurven für das Reduktionsvermögen andererseits führen eine Annäherung der zusammengehörigen Drehungs- und Reduktionskurven herbei. Dadurch wird ein allmählicher Ausgleich in den Zahlen für die prozentualen Änderungen des Drehungs- und Reduktionsvermögens geschaffen. Im allgemeinen zeigt sich aber stets die Tendenz, daß das Reduktionsvermögen ceteris paribus etwas stärker zurückgeht als das Drehungsvermögen. Der Unterschied ist aber bei den höheren Dextrosekonzentrationen größer als bei den niedrigen.

Tabelle X.

Dextrose in 5,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt = 2,25°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	2,30	2,25	—	—
1 Stunde	2,25	2,20	− 2,1	—
3 Stunden	2,25	2,20	− 2,1	—
6 "	2,15—2,20	2,10—2,15	− 4,3	—
12 "	2,05	2,00	− 10,8	—

Tabelle XI.

Dextrose in 8,1 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt = 2,25°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	2,30	2,25	—	—
1 Stunde	2,25	2,20	− 2,1	—
3 Stunden	2,20	2,15	− 4,3	—
6 "	2,05	2,00	− 10,8	—
12 "	1,80	1,75	− 21,7	—

*) Der Einfluß der Kohle auf die Drehung ist in der Zahlenreihe eliminiert.

**) Der Einfluß der Kohle und Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Tabelle XII.

Dextrose in 10 proz. Salzsäure.

Drehung der wässerigen Lösung von demselben Dextrosegehalt = 2,25°.

Dauer des Erhitzens	Drehung der salzsauren Lösung *) in °	Drehung korrigiert **) in °	Änderung der Drehung durch das Erhitzen in %	Änderung des Reduktionsvermögens durch das Erhitzen in %
Vor dem Erhitzen	2,40	2,25	—	—
1 Stunde	2,35	2,20	− 2,0	—
3 Stunden	2,15	2,00	−10,4	—
6 "	1,90	1,75	−20,8	—
12 "	1,45	1,30	−39,5	—

*) Der Einfluß der Kohle auf die Drehung ist hierbei eliminiert.
**) Der Einfluß der Kohle und der Säure auf die Drehung ist eliminiert.

Bei den 2,25% Dextrose enthaltenden Lösungen sind nur die Drehungsänderungen bestimmt worden. Anhaltspunkte für die Bildung von Isomaltose liegen hier nicht vor. Die prozentualen Drehungsverluste sind bei Verwendung von 5,1 und 8 proz. Salzsäure als Lösungsmittel geringer als bei den 5 proz. Dextroselösungen, bei 10,1 proz. Salzsäure merkwürdigerweise später etwas größer, doch fallen derartige Differenzen bei solch langer Erhitzungsdauer und so bedeutenden Verlusten nicht ins Gewicht.

Zum Schlusse sei ein Kurvenbild beigefügt, das uns den Drehungsverlauf der verschiedenen Zuckerlösungen in 5,1, 8,1 und 10,1 proz. Salzsäure wiedergibt. Aus demselben ist unschwer abzuleiten, daß die Isomaltosebildung bei Anwendung noch höherer Dextrosekonzentrationen eine bedeutende Steigerung erfahren wird.

Zur Vervollständigung der vorstehenden Angaben sei noch erwähnt, daß die Lösungen von 2,25, 5 und 10% Dextrose in den verschiedenen Salzsäurekonzentrationen in der Kälte farblos sind. Die Lösungen mit 20% Dextrose weisen einen schwachen Stich ins Gelbe auf. Sämtliche Lösungen behalten diese Eigenschaft in der Kälte aufbewahrt für lange Zeit bei. Beim Erhitzen erfahren sie jedoch bald eine allmählich von gelb in braun übergehende Verfärbung und scheiden bei fortdauerndem Erhitzen braunschwarze Niederschläge von Huminstoffen ab. Die Geschwindigkeit, mit der diese Veränderungen eintreten, hängt unter sonst gleichen Umständen von der Säurekonzentration ab.

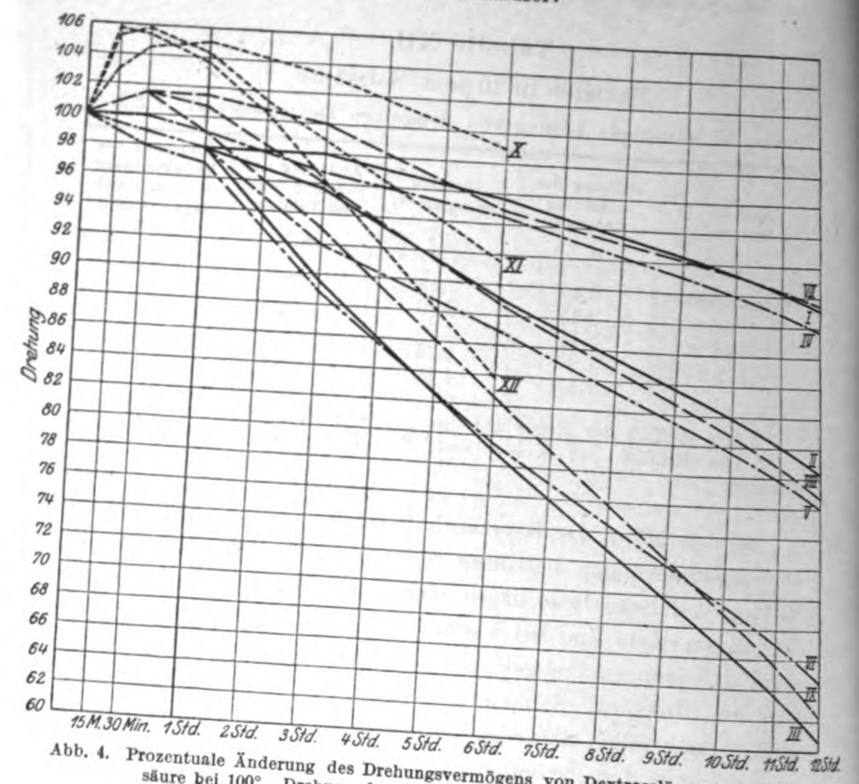


Abb. 4. Prozentuale Änderung des Drehungsvermögens von Dextroselösungen in Salzsäure bei 100°. Drehung der Ausgangslösung zu 100% gerechnet.

I.	2,25%	Dextrose	in 5,1 proz.	Salzsäure.
II.	2,25%	„	„ 8,1 „	„
III.	2,25%	„	„ 10,1 „	„
IV.	5,0%	„	„ 5,1 „	„
V.	5,0%	„	„ 8,1 „	„
VI.	5,0%	„	„ 10,1 „	„
VII.	ca. 10,0%	„	„ 5,1 „	„
VIII.	„ 10,0%	„	„ 8,1 „	„
IX.	„ 10,0%	„	„ 10,1 „	„
X.	19,45%	„	„ 5,1 „	„
XI.	19,45%	„	„ 8,1 „	„
XII.	19,45%	„	„ 10,1 „	„

Zusammenfassung.

Wird Dextrose mit Salzsäure auf 100° erhitzt, so treten Änderungen des Drehungs- und Reduktionsvermögens auf.

Enthält die salzsaure Lösung 20 oder 10% Dextrose, so findet zunächst eine Zunahme der Drehung statt bis zur Erzielung eines bestimmten Maximums; von da ab geht die Drehung mit der Erhitzung dauernd zurück. Das Maximum der prozentualen Zunahme liegt bei der 20 proz. Lösung höher als bei der 10 proz.,

ist aber für die verschiedenen Säurekonzentrationen gleich. Es wird um so früher erreicht, je höher der Säuregehalt der Lösung ist.

Der Rückgang der Drehung beim fortgesetzten Erhitzen erfolgt vom Scheitelpunkte ab annähernd linear mit der Erhitzungs dauer. Bei Lösungen gleicher Dextrosekonzentration fällt der absteigende Ast der Kurven um so steiler ab, je saurer die Lösung ist, d. h. die Geschwindigkeit der Zuckerzerstörung steigt ceteris paribus mit der Säurekonzentration.

Die absteigenden Äste der Drehungskurven verlaufen bei den Lösungen gleichen Säuregehaltes annähernd parallel; dabei liegen die Kurven der 10proz. Dextroselösungen tiefer, mit anderen Worten: Die prozentuale Abnahme des Drehungsvermögens ist bei den 10proz. Lösungen durchweg stärker als bei den Lösungen mit 20% Dextrose.

Das Reduktionsvermögen geht vom Beginn des Erhitzens an dauernd, und zwar von der 2. Stunde ab annähernd linear zurück. In der ersten Viertel- bzw. halben Stunde ist der Abfall, namentlich bei den Lösungen mit 20% Dextrose, weit stärker als in späteren Zeitabschnitten. Die prozentuale Abnahme des Reduktionsvermögens ist bei den 10% Dextrose enthaltenden Lösungen durchweg geringer als bei den 20proz.

Die Kombination der Erscheinungen — Zunahme des Drehungsvermögens bei gleichzeitiger Abnahme des Reduktionsvermögens — ist auf die Bildung von Isomaltose oder Polysacchariden (Dextrine) zurückzuführen. Ein Teil der Verminderung des Reduktionsvermögens entfällt auf die gleichzeitig stattfindende Zuckerzerstörung.

Auch in den späteren Stadien der Erhitzung ist das Reduktionsvermögen stets stärker verringert als das Drehungsvermögen; die Kurven nähern sich jedoch mit der Erhitzungsdauer.

Bei 5proz. Dextroselösungen in Salzsäure wechselnder Konzentration ist die Isomaltosebildung äußerst gering. Die Erscheinungen sind im übrigen dieselben wie bei den 10 und 20proz. Lösungen. Die prozentuale Abnahme des Drehungsvermögens ist stärker, die des Reduktionsvermögens schwächer als bei den korrespondierenden Lösungen mit 10% Dextrose.

Die Reduktions- und Drehungskurven rücken um so näher aneinander heran, je geringer der Dextrosegehalt der Lösungen wird.

Das Maximum der Drehungssteigerung (= Isomaltosebildung) hängt nicht von der Säure-, sondern von der Dextrosekonzentration der Lösung ab. Dagegen ist der Zeitpunkt, nach welchem dieses Maximum erreicht wird, von der Konzentration der Säure abhängig.

Die Ergebnisse gründen sich auf Versuche in 5,1, 8,1 und 10,1 proz. Salzsäure.

Bemerkungen zu den Mitteilungen von R. Kochmann und M. Kochmann.

Von

E. Salkowski.

(Eingegangen am 25. Januar 1921.)

1. Mit seiner Mitteilung: „Über Schwefelwasserstoffbildung aus Sulfaten durch Faeces" hat R. Kochmann[1]) auf einen sehr verbreiteten, aber wenig beachteten, ja von den letzten Autoren, die sich hierüber geäußert haben, geradezu in Abrede gestellten Vorgang hingewiesen. Sasaki und Otsuka[2]) haben in ihrer Arbeit „Experimentelle Untersuchungen über die Schwefelwasserstoffentwicklung der Bakterien aus Cystin und sonstigen Schwefelverbindungen" 21 Bakterienarten untersucht und gelangen auf S. 215 zu dem Schluß:

„Aus Taurin vermögen Bakterien kein H_2S zu entwickeln, bekanntlich auch nicht aus Sulfaten."

Gegen diesen Ausspruch habe ich[3]) Stellung genommen und auf die Ursachen hingewiesen, durch welche die genannten Autoren wahrscheinlich zu dem irrigen Schluß gelangt sind. R. Kochmann ist diese Mitteilung augenscheinlich entgangen, sonst würde er wohl auf dieselbe eingegangen sein; vermutlich ist das dadurch verursacht, daß mein Hinweis unter „Kleinen Mitteilungen" steht, solche aber erfahrungsgemäß sehr häufig nur als „Kleine Mitteilungen" in die referierende Literatur übergehen ohne Bezeichnung des betreffenden Gegenstandes und dadurch natürlich verloren gehen. Mir ist es wenigstens öfters so gegangen.

In der genannten Mitteilung beziehe ich mich auf eine weit zurückliegende Arbeit[4]), welche u. a. auch die Reduktion der

[1]) Diese Zeitschr. **112**, 191. 1920.

[2]) Diese Zeitschr. **39**, 208. 1912.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chemie **83**, 165. 1913.

[4]) Berl. klin. Wochenschr. 1888, Nr. 36.

Sulfate zu Sulfiden behandelt. Es sei mir gestattet, einen Teil des Wortlauts aus der Zeitschrift für physiologische Chemie wiederzugeben. Es heißt daselbst:

„Daß gewisse Fäulnisbakterien auch diese sehr viel schwierigere Reduktionsarbeit[1]) (nämlich der Sulfate zu Sulfiden) zu vollbringen vermögen — welche durch nascierenden Wasserstoff unter keinen Umständen gelingt[2]), ja überhaupt durch kein chemisches Mittel in wässerigen Lösungen — ist unzweifelhaft. .

Es ist mir lange bei der Untersuchung der städtischen Spüljauche aufgefallen, daß der Gehalt dieser Flüssigkeit an schwefelsauren Salzen ein ganz regelloser ist. Der Gehalt daran steht in keiner Beziehung zu der etwas wechselnden Konzentration der Spüljauche, dagegen in einem unverkennbaren Zusammenhange mit dem Grade der Fäulnis. War die Fäulnis nur wenig bemerkbar, was in kalten Wintermonaten öfters vorkommt, so war der Gehalt an Schwefelsäure (d. h. Sulfaten) besonders hoch.

Es ließ sich weiterhin leicht nachweisen, daß der Gehalt an schwefelsauren Salzen beim Aufbewahren der Spüljauche in geschlossenen Flaschen mit der Zeit abnimmt unter Eintritt starker Fäulnis und Entwicklung von Schwefelwasserstoff, welcher allerdings der Hauptmenge nach infolge des Gehaltes der Flüssigkeit an Eisen als Schwefeleisen auftritt, mitunter bis zu dem Grade, daß die Flüssigkeit kaum nach H_2S riecht, es sei denn, daß man sie ansäuert. So wurden aus 250 ccm einer Spülflüssigkeit, die fast ohne Zeichen der Fäulnis zur Untersuchung gelangte, 0,1128 g Bariumsulfat erhalten, aus derselben Flüssigkeit 21 Tage später 0,0492 g, noch 4 Tage später 0,0463 g. Eine andere Spüljauche gab bei der ersten Untersuchung 0,0898 g, 3 Monate später 0,0337 g, eine dritte bei der ersten Untersuchung 0,0812 g, 25 Tage später 0,0562 g.

Von besonderem Interesse endlich war die Untersuchung einer vierten Probe, welche sofort nach der Entnahme in eine vollständig damit gefüllte Glasstöpselflasche gegeben war und in dieser 14 Tage gestanden hatte. 250 ccm dieser stark fauligen Flüssigkeit lieferten nur 0,004 g Bariumsulfat. In diesem Falle also, der besonders günstige Bedingungen geboten hatte, war die Reduktion der Sulfate beinahe bis auf den letzten Rest erfolgt."

Die Reduktion der Sulfate zu Sulfiden findet in einem enormen, man könnte sagen, gigantischen Maßstabe in allen mit Schwemmkanalisation ausgerüsteten Städten statt, war aber bisher nicht nach der quantitativer Richtung verfolgt. Gewiß ist auch die von R. Kochmann aufgefundene Schnelligkeit, mit der die

---

[1]) Im Vorhergehenden handelt es sich um die Bildung von Schwefelwasserstoff aus dem sog. neutralen Schwefel des Harns.

[2]) Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß Bakterien die Reduktion auf einem anderen Wege bewirken als durch nascierenden Wasserstoff.

Reduktion wenigstens mit Kaninchenfaeces erfolgt, als ein unerwartetes Resultat zu bezeichnen. Wenn ich am Schlusse meiner damaligen Mitteilung die Reduktion der Sulfate zu Sulfiden durch Darmbakterien nur als möglich hingestellt habe, so geht aus dem Zusammenhang hervor, daß ich dabei an die Tätigkeit der Bakterien im Darm des lebenden Individuums gedacht habe. Die von Kochmann angezogene Beobachtung Roese hierüber ist meines Wissens erst später gemacht.

2. Die außerordentlich interessante Mitteilung M. Kochmanns: „Quantitative Untersuchungen des Magnesium-Kalk und Barium-Antagonismus"[1]) erinnert mich an alte Versuche von mir[2]), die ich bei dieser Gelegenheit, da sie nicht ohne Interesse sind, der Vergessenheit entreißen möchte. Meine Absicht war, beim lebenden Tier durch Verstopfung der Harnkanälchen die Funktion der Niere allmählich ohne operativen Eingriff auszuschließen. Die Verstopfung sollte durch Bildung unlöslicher Niederschläge geschehen. Ich nahm an, daß diese Niederschläge sich nicht im Blut, sondern erst in der Niere bilden würden. Zu den Versuchen wählte ich Natriumsulfat und Strontiumnitrat oder Strontiumchlorid[3]). Die Versuche sind an Kaninchen angestellt. Meistens kamen 10proz. Lösungen in Mengen von 8—10 ccm pro Tag in Anwendung. Es wurden bald beide Substanzen subcutan eingeführt, an verschiedenen Körperstellen, bald beide in den Magen, die eine vormittags, die andere abends, bald die eine subcutan, die andere in den Magen und die Einspritzungen mindestens 8 Tage lang gemacht. Der Erfolg entsprach den Erwartungen sehr wenig. In vielen Fällen blieben die Harnkanälchen ganz frei von Niederschlägen, in anderen bildeten sich geringe Mengen davon und nur in einem Falle war ein erheblicher Teil der Harnkanälchen mit großen, schon makroskopisch sichtbaren Kristallen verstopft. Interesse bot auch das Verhalten des Harns. Derselbe enthielt reichlich schwefelsaure Salze und Strontium nebeneinander. Beim Ansäuern mit Salzsäure wurde er zunächst

[1]) Diese Zeitschr. 112, 191. 1920.

[2]) Virchows Archiv 69, 12 des S.-A.

[3]) Strontium statt Barium, das an sich geeigneter erschien, nahm ich, weil ich die giftige Wirkung des Bariums fürchtete. Die Einwirkung der Uransalze und der chromsauren Salze auf die Nieren war damals noch nicht bekannt.

klar, falls er, wie gewöhnlich bei alkalischer Reaktion, trüb entleert war, sehr bald aber — je nach dem Gehalt an Strontium früher oder später — entstand ein feinkörniger, mikrokristallinischer Niederschlag von Strontiumsulfat. Die Menge desselben betrug in einem Falle, in dem sie bestimmt wurde, 0,102 g in 100 ccm. Kaninchenharn vermag also Strontiumsulfat in Lösung zu halten bzw. die Ausscheidung desselben zu verhindern. Die Alkalescenz ist übrigens keine notwendige Bedingung dafür. Als die Versuche bei Fütterung mit Weizen gemacht wurden, bei welcher klarer, saurer Harn entleert wird, schied sich a u c h erst nach Zusatz von Salzsäure Strontiumsulfat aus.

Über die Trennung aliphatischer Amine voneinander und von Ammoniak.

Von

Hartwig Franzen und **Artur Schneider.**

(Aus dem Chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.)

(Eingegangen am 26. Januar 1921.)

In Pflanzen sind gelegentlich Ammoniak und aliphatische Amine nachgewiesen worden. Da flüchtige Basen sich leicht aus den Pflanzen abscheiden lassen und dadurch der Untersuchung bequem zugänglich sind, war es uns darum zu tun, ein Verfahren zu besitzen, welches gestattet, einerseits das Ammoniak von den Aminen zu trennen und andererseits das Gemenge der Amine möglichst quantitativ zu zerlegen. Ein für den gewünschten Zweck geeignetes Verfahren war evtl. das von Maurice François[1]) und von J. Berthaume[2]) angegebene, welches zum Teil auf Vorarbeiten von J. Weiss[3]) beruht. Die Trennung der drei Methylamine voneinander und von Ammoniak wird nach der Methode in folgender Weise durchgeführt.

Die Chlorhydrate werden in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Seesand gemischt, das Ganze im Vakuumexsiccator scharf getrocknet und in einem Soxhletapparat erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Hierbei gehen die Chlorhydrate des Dimethylamins und des Trimethylamins in Lösung, während die des Methylamins und des Ammoniaks ungelöst zurückbleiben.

Die Chloroformlösung wird zur Trockne gebracht, der Rückstand gewogen, in der 2000fachen Menge Wasser gelöst, auf 0° abgekühlt, mit Jod-Jodkaliumlösung versetzt und eine Stunde bei 0° stehengelassen. Hierbei scheidet sich das Trimethylamin als Per-

---

[1]) C. r. **144**, 567. 1907.

[2]) C. r. **150**, 1253. 1910.

[3]) A. **267**, 257. 1892.

jodid ab; es wird abgesaugt, mit wenig verdünnter Jod-Jodkaliumlösung nachgewaschen, in Natriumsulfitlösung gelöst, und aus der alkalisch gemachten Lösung die Base überdestilliert und titriert. Das Filtrat vom Trimethylaminperjodid wird mit Natriumsulfitlösung entfärbt und ebenso wie die Trimethylaminlösung weiterbehandelt.

Der Inhalt der Extraktionshülse wird mit heißem Wasser ausgezogen, die wässerige Lösung unter Zusatz von etwas Natronlauge und Sodalösung mit gelbem Quecksilberoxyd geschüttelt, wobei das Ammoniak in eine unlösliche komplexe Quecksilberverbindung übergeht, während das Methylamin gelöst bleibt. Die Quecksilberverbindung des Ammoniaks wird abfiltriert und aus dem Filtrat das Methylamin überdestilliert und titriert.

Bei der Beschreibung der Methode sind keine Beleganalysen gegeben, so daß man sich über ihre Genauigkeit kein Bild machen kann. Wir haben deshalb die Methode in ihren einzelnen Phasen nachgeprüft und auch noch die Äthylamine in den Bereich der Untersuchungen gezogen, um zu sehen, inwieweit die Methode anwendbar ist, um das in den Pflanzen vorhandene Gemenge der Basen zu zerlegen und die einzelnen Bestandteile möglichst quantitativ zu bestimmen.

Die Forscher haben kein Verfahren angegeben, um das Ammoniak aus dem Ammoniummercurioxyd wieder abzuscheiden und quantitativ zu bestimmen. Dies war für unsere Zwecke notwendig, um die Menge des in den Pflanzen enthaltenen Ammoniaks zu bestimmen. Versuche, die Quecksilberverbindung durch Destillation mit starker Natronlauge zu zerlegen, schlugen fehl, da hierbei nur ein Teil des Ammoniaks in Freiheit gesetzt wird. Es gelingt jedoch leicht, die Base abzuscheiden, wenn die Quecksilberverbindung mit überschüssiger Ameisensäure auf dem Wasserbade erwärmt wird; hierdurch wird das Quecksilberoxyd zu metallischem Quecksilber reduziert und das Ammoniak in Freiheit gesetzt; aus dem Reaktionsgemisch läßt es sich nach dem Alkalischmachen übertreiben und titrimetrisch bestimmen.

Zunächst wurde das Verhalten des Ammoniaks gegen gelbes Quecksilberoxyd geprüft, um zu sehen, ob es tatsächlich quantitativ von diesem zurückgehalten wird und quantitativ wiedergewonnen werden kann. Zu diesem Zweck wurde eine bestimmte Menge Ammonchlorid in Wasser gelöst, die nötige Menge Natron-

lauge, Sodalösung und Quecksilberoxyd hinzugefügt und 2 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die Quecksilberverbindung wurde abgesaugt, mit schwach alkalischem Wasser gewaschen, mit Ameisensäure reduziert, alkalisch gemacht, das Ammoniak übergetrieben und titriert. Von dem angewandten Ammonchlorid wurden in 5 Versuchen wiedergefunden

$$99,8 - 99,8 - 98,6 - 99,5 - 99,6\% .$$

Resultate, die durchaus befriedigend sind. Das Filtrat von den Quecksilberverbindungen wurde ebenfalls alkalisch gemacht, die Basen abgetrieben und titriert; bei den 5 Versuchen wurden gefunden

$$0,3 - 0,2 - 0,0 - 0,1 - 0,0\%,$$

berechnet auf Ammonchlorid. Es zeigt sich also, daß das Ammoniak nicht völlig durch das Quecksilberoxyd aufgenommen wird.

Weiter wurde das Verhalten des Methylamins gegen gelbes Quecksilberoxyd untersucht, wofür natürlich ein völlig ammoniakfreies Präparat verwendet werden mußte. Zu diesem Zwecke wurde das technische Präparat von Methylaminchlorhydrat, welches uns zur Verfügung stand und welches 17% Ammonchlorid enthielt und mit Nesslers Reagens einen dicken braunen Niederschlag gab, einer zweimaligen Reinigung mit Quecksilberoxyd unterworfen; es gab dann keine Braunfärbung mit Nesslers Reagens mehr, sondern einen rein gelben Niederschlag. Zur Untersuchung seines Verhaltens gegen Quecksilberoxyd wurde ebenso wie beim Ammonchlorid verfahren. Es zeigte sich, daß eine recht erhebliche Menge Methylamin — 0,6% — berechnet auf Chlorhydrat in dem Quecksilberoxyd bleiben; in dem Filtrat wurden nur 98,0—98,2% wiedergefunden.

Dann wurde die Trennung von Ammoniak und Methylamin durch gelbes Quecksilberoxyd untersucht, und zwar zunächst in der Weise, daß ein Gemisch äquimolekularer Mengen der beiden Basen (je 5 MM der Chlorhydrate) analysiert wurde; weiter wurde dann die Menge des Ammoniumchlorids vermehrt und die des Methylaminchlorhydrates vermindert, so daß bei der dritten Versuchsreihe auf 9 MM Ammonchlorid 1 MM Methylaminchlorhydrat kam. Es zeigte sich, daß immer zuviel Ammoniak und zu wenig Methylamin gefunden wird, und zwar gestaltet sich das Ergebnis um so schlechter, je mehr Ammonchlorid und je weniger Methyl-

aminchlorhydrat angewandt wird. Das rührt natürlich daher, wie aus dem vorhergehenden Versuch zu ersehen ist, daß, je mehr Quecksilberoxyd angewandt werden muß, um das Ammoniak zu binden, auch desto mehr Methylamin zurückgehalten wird. Es scheint daher durchaus möglich, daß bei einem bestimmten Verhältnis von Ammonchlorid zu Methylaminchlorhydrat, d. h. wenn ein sehr großer Überschuß des ersteren vorhanden ist, alles Methylamin beim Quecksilberoxyd bleibt. Nun ist es sehr wahrscheinlich, daß unter den flüchtigen basischen Stoffen der Pflanzen das Ammoniak bei weitem überwiegt, wie ja auch aus der folgenden Abhandlung hervorgeht. Es schien deshalb geboten, das Methylamin zunächst anzureichern, was am besten durch Ausziehen des Gemenges der Chlorhydrate mit absolutem Alkohol geschehen konnte. Nach dieser Vorbehandlung wurden bei Anwendung der 15- und 30fachen Menge Ammonchlorid auf einen Teil Methylaminchlorhydrat immer noch annehmbare Werte erhalten.

Weiter wurde die Löslichkeit der vier Chlorhydrate in Chloroform untersucht. Es zeigte sich, daß Ammoniumchlorid und Methylaminchlorhydrat bei 12stündiger Extraktion nichts an Chloroform abgeben. Allerdings wurde bei der Aufarbeitung des Extraktionshülseninhaltes beim Ammonchlorid nur 98% und beim Methylaminchlorhydrat nur 97,2% wiedergefunden. Die Ursache sind aber lediglich mechanische Verluste; es läßt sich nicht vermeiden, daß beim Auskratzen des in einer Glasschale getrockneten Gemisches von Sand und Chlorhydrat kleine Mengen des letzteren an den Wänden der Schale haftenbleiben. Bei 12stündiger Extraktion des Gemisches von Seesand und Dimethylaminchlorhydrat und Trimethylaminchlorhydrat mit Chloroform gehen die Chlorhydrate quantitativ in die Lösung über, denn nach dieser Zeit konnten in dem Hülseninhalt keine Basen mehr nachgewiesen werden. Die im Chloroform wiedergefundenen Mengen — 95,4 und 95,8% — entsprechen allerdings nicht ganz den angewandten, jedoch ist die Differenz auch in diesem Falle wieder auf mechanische Verluste beim Umfüllen des Gemisches zurückzuführen.

Die Untersuchung des Verhaltens von Dimethylamin gegen Jod-Jodkaliumlösung ergab, daß in der angewandten Verdünnung tatsächlich kein Perjodid abgeschieden wird, und daß sich im Filtrat die Base quantitativ wiederfindet.

Bei der Untersuchung des Verhaltens von Trimethylamin

gegen Jod-Jodkaliumlösung wurden als Perjodid 98,0 u. 98,3% der Base wiedergefunden; ein geringer Teil, 0,6—1,0%, geht jedoch in das Filtrat über.

Bei der Trennung der beiden Basen wurde entsprechend den oben erwähnten Versuchen etwas zu wenig Trimethylamin und etwas zu viel Dimethylamin gefunden.

Die Versuche zeigen, daß entsprechend den Angaben der französischen Forscher sich das Gemisch der Chlorhydrate von Ammoniak und den drei Methylaminen durch Extraktion mit Chloroform quantitativ in zwei Gruppen scheiden läßt, und zwar sind unlöslich Ammonchlorid und Methylaminchlorhydrat, löslich Di- und Trimethylaminchlorhydrat. Die Trennung der Bestandteile der beiden Gruppen läßt sich beim Di- und Trimethylaminchlorhydrat mit Hilfe von Jod-Jodkaliumlösung einigermaßen quantitativ durchführen, jedoch findet sich beim Dimethylamin etwas Trimethylamin. Etwas weniger befriedigend gestalten sich die Verhältnisse bei der Trennung des Ammoniaks vom Methylamin mit Quecksilberoxyd, wenn die Menge des ersteren nicht zu stark überwiegt; es bleibt auch in diesem Falle immer etwas Methylamin beim Ammoniak und etwas des letzteren findet sich beim ersteren. Überwiegt das Ammoniak aber sehr stark, so werden die Zahlen recht schlecht; in diesem Falle ist es geboten, zunächst eine Anreicherung des Methylamins durch Extraktion des Gemisches der Chlorhydrate mit absolutem Alkohol vorzunehmen.

Nun kommen in den Pflanzen aber nicht nur Methylamine, sondern auch höhere Amine vor, und es war von besonderem Interesse, zu sehen, ob sich die bei den ersteren Aminen brauchbare Trennungsmethode auch auf höhere Amine anwenden ließe. Um das zu erfahren, wurden Versuche mit den Äthylaminen angestellt.

Das Verhalten des Äthylamins gegen gelbes Quecksilberoxyd war das gleiche wie das des Methylamins, und auch bei der Trennung des Ammoniaks vom Äthylamin ergaben sich gleiche Verhältnisse, so daß sich mit Hilfe von Quecksilberoxyd eine angenäherte Trennung dieser beiden Basen durchführen läßt. Dagegen kann Äthylaminchlorhydrat von den Chlorhydraten des Di- und Triäthylamins durch Chloroform nicht getrennt werden, da sie in diesem Lösungsmittel alle drei löslich sind. Ebensowenig läßt

sich Diäthylamin von Triäthylamin mit Hilfe von Jod-Jodkaliumlösung trennen, da schon in recht starker Verdünnung die erste Base ein Perjodid gibt und aus der Lösung der zweiten das Perjodid nicht quantitativ ausfällt. Was für die Äthylamine gilt, wird voraussichtlich für alle höheren Amine Gültigkeit haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. Die Chlorhydrate der in den Pflanzen vorkommenden flüchtigen Basen lassen sich mit Hilfe von Chloroform in zwei Gruppen teilen; in dem Lösungsmittel unlöslich sind Ammonchlorid und Methylaminchlorhydrat, löslich Di- und Trimethylaminchlorhydrat, die Chlorhydrate der Äthylamine und voraussichtlich auch die der höheren Amine.

2. Ammoniak und Methylamin lassen sich mit Hilfe von gelbem Quecksilberoxyd befriedigend voneinander trennen, falls die Menge des Ammoniaks nicht zu stark überwiegt; ist das der Fall, so ist eine Anreicherung des Methylamins durch Extraktion der Chlorhydrate mit absolutem Alkohol geboten. Es findet sich jedoch immer etwas Methylamin beim Ammoniak und Ammoniak beim Methylamin. Es ist deshalb nicht zulässig, beim Auffinden von Basen in dem Filtrat vom Quecksilberoxyd ohne weiteres auf Methylamin zu schließen, sondern sie müssen, namentlich, wenn nur kleinere Mengen vorhanden sind, näher gekennzeichnet und die Trennung eventuell noch einmal durchgeführt werden.

3. Dimethylamin und Trimethylamin lassen sich mit Hilfe von Jod-Jodkaliumlösung befriedigend voneinander trennen. Eine Trennung des Diäthylamins und Triäthylamins auf diesem Wege ist jedoch nicht möglich und voraussichtlich auch nicht die der höheren sekundären und tertiären Amine.

4. Ammoniak wird sich voraussichtlich von den meisten Aminen mit Hilfe von gelbem Quecksilberoxyd abtrennen lassen; man wird also, sobald sich aus dem Quecksilberrückstand größere Mengen Basen abscheiden lassen, auf Ammoniak schließen dürfen.

Verhalten von Ammoniak gegen gelbes Quecksilberoxyd.

0,2671 g (5 MM) Ammoniumchlorid wurden in einen Kjeldahlkolben in 150 ccm Wasser gelöst, 7 ccm 30 proz. Natronlauge, 10 ccm 40 proz. Sodalösung und 5 g fein gepulvertes gelbes Quecksilberoxyd hinzugefügt und 2 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die Quecksilberverbindungen wurden abgesaugt und 5 mal mit je 10 ccm einer Lösung von 20 ccm 30 proz. Natronlauge und 40 ccm 40 proz. Sodalösung in 1 l Wasser ausgewaschen, in einen Kjeldahlkolben gespült, 5 ccm Ameisensäure hinzugefügt und 20 Minuten auf dem siedenden Wasserbade erwärmt. Das Reaktionsgemenge wurde mit Wasser verdünnt, überschüssige Natronlauge hinzugefügt, das Ammoniak abgetrieben, in 60,0 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure aufgefangen und die nicht verbrauchte Säure mit $^{n}/_{10}$-Baryt-Lösung zurücktitriert.

Das Filtrat von den Quecksilberverbindungen wurde ebenfalls in einen Kjeldahldestillationsapparat gegeben, mit Natronlauge alkalisch gemacht, die Basen übergetrieben und wie vorher bestimmt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 49,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl entsprechend 0,2670 g Ammonchlorid, 99,8%.

Filtrat: verbraucht 0,15 ccm $^{n}/_{10}$-HCl entsprechend 0,0008 g Ammonchlorid, 0,3%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 49,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2760 g Ammonchlorid, 99,8%.

Filtrat: verbraucht 0,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0005 g Ammonchlorid, 0,2%.

3. Quecksilberrückstand: verbraucht 49,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2665 g Ammonchlorid, 98,6%.

Filtrat: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

4. Quecksilberrückstand: verbraucht 49,75 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2663 g Ammonchlorid, 99,5%.

Filtrat: verbraucht 0,05 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0003 g Ammonchlorid, 0,1%.

5. Quecksilberrückstand: verbraucht 49,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2665 g Ammonchlorid, 99,6%.

Filtrat: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

Verhalten von Methylamin gegen gelbes Quecksilberoxyd.

Für die Versuche stand uns ein technisches Methylaminchlorhydrat zur Verfügung, welches noch recht beträchtliche Mengen Ammoniumchlorid enthielt. Um seine Menge zu bestimmen, wurden 0,3373 g des Salzes wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe behandelt.

Quecksilberrückstand: verbraucht 8,4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,045 g Ammonchlorid, 16,8%.

Filtrat: verbraucht 40,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2749 g Methylaminchlorhydrat, 81,4%.

Das Salz enthielt also rund 17% Ammonchlorid.

Zu seiner Entfernung wurden 100 g Methylaminchlorhydrat in 1 l Wasser gelöst, eine Lösung von 100 g Natron und 500 g Krystallsoda in 1 l Wasser und 300 g Quecksilberoxyd hinzugefügt und 2 Stunden geschüttelt. Die Quecksilberverbindungen wurden dann abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen, das Filtrat der Wasserdampfdestillation unterworfen und das Destillat in verdünnter Salzsäure aufgefangen. Die Lösung wurde dann auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und der Salzrückstand noch einmal dem gleichen Reinigungsverfahren unterzogen und zum Schlusse im Vakuumexsiccator über Kali und Schwefelsäure getrocknet. Ausbeute 70 g. Das so gereinigte Salz gab mit Nesslers Reagens eine rein gelbe Fällung.

0,3373 g (5 MM) Methylaminchlorhydrat wurden ebenso wie das Ammonchlorid mit Quecksilberoxyd behandelt und Quecksilberrückstand und Filtrat in gleicher Weise verarbeitet.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 0,3 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0020 g Methylaminchlorhydrat, 0,6%.

Filtrat: verbraucht 49,0 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3309 g Methylaminchlorhydrat, 98,0%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 0,3 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0020 g Methylaminchlorhydrat, 0,6%.

Filtrat: verbraucht 49,1 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3316 g Methylaminchlorhydrat, 98,2%.

Trennung von Ammoniak und Methylamin.

1. Versuchsreihe.

0,2673 g (5 MM) Ammonchlorid und 0,3373 g (5 MM) Methylaminchlorhydrat wurden in 200 ccm Wasser gelöst, 7 ccm 30 proz. Natronlauge, 10 ccm 20 proz. Sodalösung und 5 g gelbes Quecksilberoxyd hinzugefügt, 2 Stunden geschüttelt und dann weiter wie bei den vorhergehenden Versuchen auch behandelt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 52,3 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2799 g Ammonchlorid, 104,6%.

Filtrat: verbraucht 48,1 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3249 g Methylaminchlorhydrat, 96,2%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 52,1 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2788 g Ammonchlorid, 104,2%.

Filtrat: verbraucht 48,0 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3242 g Methylaminchlorhydrat, 96,0%.

2. Versuchsreihe.

0,4009 g (7,5 MM) Ammonchlorid und 0,1686 g (2,5 MM) Methylaminchlorhydrat, 200 ccm Wasser, 11 ccm 30 proz. Natronlauge, 15 ccm 20 proz. Sodalösung, 7,5 g Quecksilberoxyd wurden wie bei dem vorhergehenden Versuch behandelt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 76,9 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4116 g Ammonchlorid, 107,6%.

Filtrat: verbraucht 22,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1540 g Methylaminchlorhydrat, 91,2%.

2. **Quecksilberrückstand:** verbraucht 76,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4110 g Ammonchlorid, 107,2%.

Filtrat: verbraucht 22,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1533 g Methylaminchlorhydrat, 90,8%.

3. Versuchsreihe.

0,4811 g (9 MM) Ammonchlorid und 0,0675 g (1 MM) Methylaminchlorhydrat, 200 ccm Wasser, 13 ccm 30proz. Natronlauge, 18 ccm 20proz. Sodalösung und 9 g Quecksilberoxyd wurden wie vorher auch behandelt.

1. **Quecksilberrückstand:** verbraucht 91,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4870 g Ammonchlorid, 110,0%.

Filtrat: verbraucht 8,65 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0584 g Methylaminchlorhydrat, 86,5%.

2. **Quecksilberrückstand:** verbraucht 91,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4876 g Ammonchlorid, 111,0%.

Filtrat: verbraucht 8,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0588 g Methylaminchlorhydrat, 87,0%.

4. Versuchsreihe.

0,3373 g (5 MM) Methylaminchlorhydrat und 5,0 g Ammonchlorid wurden in wenig Wasser gelöst, auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, in eine Extraktionshülse gegeben, 24 Stunden im Vakuumexsiccator über Kali und Schwefelsäure getrocknet und dann 1 Stunde im Soxhletapparat mit absolutem Alkohol extrahiert. Die alkoholische Lösung wurde zur Trockne gebracht, der Salzrückstand gewogen, in 250 ccm Wasser gelöst, 42 ccm 30proz. Natronlauge, 60 ccm 20proz. Sodalösung und 30 g gelbes Quecksilberoxyd hinzugefügt und wie vorher behandelt.

1. **Filtrat:** verbraucht 42,3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2857 g Methylaminchlorhydrat, 84,6%.

2. **Filtrat:** verbraucht 42,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2843 g Methylaminchlorhydrat, 84,2%.

0,3373 g (5 MM) Methylaminchlorhydrat und 10,0 g Ammonchlorid wurden wie vorher auch behandelt. Der gewogene Salzrückstand wurde in 250 ccm Wasser gelöst, 50 ccm 30proz. Natronlauge, 85 ccm 20proz. Sodalösung und 42 g gelbes Quecksilberoxyd hinzugefügt und weiter wie bei den vorhergehenden Versuchen auch behandelt.

1. **Filtrat:** verbraucht 41,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2823 g Methylaminchlorhydrat, 83,6%.

2. **Filtrat:** verbraucht 41,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2810 g Methylaminchlorhydrat, 83,2%.

Löslichkeit von Ammonchlorid und Methylaminchlorhydrat in Chloroform.

0,2673 g Ammonchlorid (5 MM) wurden in wenig Wasser gelöst, 5 g Quarzsand hinzugegeben, im Vakuumexsiccator über Kali und Schwefelsäure getrocknet, das Gemisch in eine Extraktionshülse gefüllt, diese noch-

mals 24 Stunden getrocknet und in einem Soxlethapparat 24 Stunden mit Chloroform extrahiert. Das Lösungsmittel wurde verdampft, wobei kein Rückstand hinterblieb. Die Extraktionshülse wurde vom Chloroform befreit, mit heißem Wasser extrahiert und in der wässerigen Lösung das Ammonchlorid durch Titration bestimmt.

Verbraucht 49,0 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2623 g Ammonchlorid, 98,0%.

0,3373 g (5 MM) Methylaminchlorhydrat wurden in der gleichen Weise wie das Ammonchlorid behandelt. Die Chloroformlösung gab nach dem Verdampfen keinen Rückstand.

Verbraucht 48,6 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3282 g Methylaminchlorhydrat, 97,2%.

Löslichkeit von Di- und Trimethylaminchlorhydrat in Chloroform.

0,2444 g (3 MM) Dimethylaminchlorhydrat und 0,2864 g (3 MM) Trimethylaminchlorhydrat wurden in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit Quarzsand gemischt, das Ganze im Vakuumexsiccator über Kali und Schwefelsäure getrocknet, die Mischung in eine Extraktionshülse gegeben, diese nochmals 24 Stunden getrocknet und dann 12 Stunden mit frisch destilliertem Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wurde verdampft, der Salzrückstand mit Wasser aufgenommen und in der Lösung die Basen durch Titration bestimmt. Die Extraktionshülse wurde vom Chloroform befreit, mit heißem Wasser ausgezogen und in der Lösung die Basen ebenfalls durch Titration bestimmt.

1. Chloroformauszug: verbraucht 57,2 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 95,4%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^n/_{10}$-HCl.

2. Chloroformauszug: verbraucht 57,5 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 95,8%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^n/_{10}$-HCl.

Verhalten von Dimethylamin gegen Jod-Jodkaliumlösung.

0,2444 g (3 MM) Dimethylaminchlorhydrat wurden zu 300 ccm in Wasser gelöst, 100 ccm der Lösung auf 0° abgekühlt, mit 30 ccm einer zuvor ebenfalls auf 0° abgekühlten Lösung von 127 g Jod und 150 g Kaliumjodid zu 1 l Wasser versetzt und eine Stunde bei 0° stehengelassen. Die Lösung, in welcher keinerlei Abscheidung zu bemerken war, wurde über Glaswolle abgesaugt und diese mit 5 ccm einer auf 0° abgekühlten Mischung von 1 Teil der Jod-Jodkaliumlösung und 3 Teilen Wasser nachgewaschen. Auf dem Filter blieb nicht der geringste Rückstand. Das Filtrat wurde in einen Kjeldahlkolben gegeben, mit Natriumsulfitlösung entfärbt und die Basen nach dem Übertreiben durch Titration bestimmt.

1. Verbraucht 30,3 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2470 g Dimethylaminchlorhydrat, 101,1%.

2. Verbraucht 30,15 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2458 g Dimethylaminchlorhydrat, 100,5%.

Verhalten von Trimethylamin gegen Jod-Jodkaliumlösung.

0,2864 g (3 MM) Trimethylaminchlorhydrat wurden zu 300 ccm in Wasser gelöst und 100 ccm der Lösung wie bei dem vorhergehenden Versuch mit der Jod-Jodkaliumlösung behandelt. Die in reichlicher Menge abgeschiedenen Perjodidkrystalle wurden über Glaswolle abgesaugt und mit 5 ccm einer auf 0° abgekühlten Lösung von 1 Teil der Jodlösung und 3 Teilen Wasser nachgewaschen. Die Krystalle wurden aus dem Filter mit $^n/_1$-Natriumsulfitlösung herausgelöst, die Lösung mit Wasser verdünnt und die Basen in der üblichen Weise bestimmt. Das Filtrat von den Perjodidkrystallen wurde mit Natriumsulfitlösung entfärbt und in der Lösung die Basen ebenfalls bestimmt.

1. Niederschlag: verbraucht 29,4 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2809 g Trimethylaminchlorhydrat, 98,0%.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0019 g Trimethylaminchlorhydrat, 0,6%.

2. Niederschlag: verbraucht 29,55 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2824 g Trimethylaminchlorhydrat, 98,3%.

Filtrat: verbraucht 0,3 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0029 g Trimethylaminchlorhydrat, 1,0%.

Trennung von Di- und Trimethylamin mit Jod-Jodkaliumlösung.

0,2037 g (2,5 MM) Dimethylaminchlorhydrat und 0,2387 g (2,5 MM) Trimethylaminchlorhydrat wurden zu 200 ccm in Wasser gelöst und 150 ccm dieser Lösung wie vorher mit 45 ccm Jod-Jodkaliumlösung versetzt und eine Stunde bei 0° stehengelassen. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit verdünnter Jod-Jodkaliumlösung nachgewaschen, in $^n/_1$-Natriumsulfitlösung gelöst und die Basen wie früher bestimmt. Das Filtrat wurde mit $^n/_1$-Natriumsulfitlösung entfärbt und die Basen durch Titration ermittelt.

1. Niederschlag: verbraucht 24,2 ccm $^n/_1$-HCl, entsprechend 0,2312 g Trimethylaminchlorhydrat, 97,2%.

Filtrat: verbraucht 25,8 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2103 g Dimethylaminchlorhydrat, 103,2%.

2. Niederschlag: verbraucht 24,0 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2293 g Trimethylaminchlorhydrat, 96,0%.

Filtrat: verbraucht 25,5 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2079 g Dimethylaminchlorhydrat, 102,0%.

Verhalten von Äthylamin gegen Quecksilberoxyd.

0,4077 g (5 MM) Äthylaminchlorhydrat wurden ebenso wie beim Ammoniumchlorid mit 5 g Quecksilberoxyd geschüttelt und das Reaktionsgemenge in der gleichen Weise aufgearbeitet.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 0,5 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0041 g Äthylaminchlorhydrat, 0,8%.

Filtrat: verbraucht 48,0 ccm $^n/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3913 g Äthylaminchlorhydrat, 96,0%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 0,4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0033 g Äthylaminchlorhydrat, 0,8%.

Filtrat: verbraucht 48,3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3938 g Äthylaminchlorhydrat, 96,6%.

Trennung von Ammoniak und Äthylamin.

1. Versuchsreihe.

0,2673 g (5 MM) Ammonchlorid und 0,4077 g (5 MM) Äthylaminchlorhydrat wurden ebenso wie bei der Trennung von Ammoniak und Äthylamin behandelt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 52,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2788 g Ammonchlorid, 104,2%.

Filtrat: verbraucht 47,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3873 g Äthylaminchlorhydrat, 95,0%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 51,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2778 g Ammonchlorid, 103,8%.

Filtrat: verbraucht 48,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3913 g Äthylaminchlorhydrat.

2. Versuchsreihe.

0,4009 g (7,5 MM) Ammonchlorid und 0,2039 g (2,5 MM) Äthylaminchlorhydrat wurden ebenso wie bei der analogen Versuchsreihe bei der Trennung von Methylamin und Ammoniak behandelt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 77,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4121 g Ammonchlorid, 108,0%.

Filtrat: verbraucht 22,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1838 g Äthylaminchlorhydrat, 90,4%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 76,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4110 g Ammonchlorid, 107,2%.

Filtrat: verbraucht 22,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1838 g Äthylaminchlorhydrat, 90,4%.

3. Versuchsreihe.

0,4811 g (9 MM) Ammonchlorid und 0,0815 g (1 MM) Äthylaminchlorhydrat wurden ebenso wie bei der analogen Versuchsreihe bei der Trennung von Ammoniak und Äthylamin behandelt.

1. Quecksilberrückstand: verbraucht 90,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4865 g Ammonchlorid, 109,0%.

Filtrat: verbraucht 8,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0701 g Äthylaminchlorhydrat, 86,0%.

2. Quecksilberrückstand: verbraucht 91,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,4876 g Ammonchlorid, 111,0%.

Filtrat: verbraucht 8,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0709 g Äthylaminchlorhydrat, 86,2%.

Löslichkeit von Äthylaminchlorhydrat in Chloroform.

0,2446 g (3 MM) Äthylaminchlorhydrat wurden in wenig Wasser gelöst, die Lösung mit 5 g Quarzsand gemischt und dann ebenso weiter behandelt, wie bei der Bestimmung der Löslichkeit der Methylaminchlorhydrate in Chloroform.

1. **Chloroformauszug:** verbraucht 29,25 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2385 g Äthylaminchlorhydrat, 97,5%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

2. **Chloroformauszug:** verbraucht 29,4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2397 g Äthylaminchlorhydrat, 98,0%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

Löslichkeit von Di- und Triäthylaminchlorhydrat in Chloroform.

0,2192 g (2 MM) Diäthylaminchlorhydrat und 0,2752 g (2 MM) Triäthylaminchlorhydrat wurden ebenso behandelt wie bei dem analogen Versuch mit den entsprechenden Methylaminkörpern.

1. **Chloroformauszug:** verbraucht 39,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 99,7%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0%.

2. **Chloroformauszug:** verbraucht 39,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 99,2%.

Wässerige Lösung: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0%.

Verhalten von Diäthylamin gegen Jod-Jodkaliumlösung.

0,5479 g (5 MM) Diäthylaminchlorhydrat wurden zu 700 ccm in Wasser gelöst und 100 ccm der Lösung ebenso behandelt wie bei dem analogen Versuch mit Dimethylamin und Trimethylamin. In diesem Falle bildete sich ein recht erheblicher Niederschlag von Diäthylaminperjodid.

1. **Niederschlag:** verbraucht 22,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2498 g Äthylaminchlorhydrat, 45,6%.

Filtrat: verbraucht 26,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2860 g Äthylaminchlorhydrat, 52,2%.

2. **Niederschlag:** verbraucht 23,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2531 g Äthylaminchlorhydrat, 46,2%.

Filtrat: verbraucht 25,9 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2838 g Äthylaminchlorhydrat, 51,8%.

Verhalten von Triäthylamin gegen Jod-Jodkaliumlösung.

0,4128 g (3 MM) Triäthylaminchlorhydrat wurden (um die gleiche Verdünnung wie beim Trimethylamin zu erhalten) in 430 ccm Wasser gelöst und 100 ccm dieser Lösung wie beim Trimethylamin behandelt.

1. **Niederschlag:** verbraucht 22,4 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3082 g Triäthylaminchlorhydrat, 74,7%.

Filtrat: verbraucht 9,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1307 g Triäthylaminchlorhydrat, 31,7%.

2. **Niederschlag:** verbraucht 22,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3055 g Trimethylaminchlorhydrat, 74,0%.

Filtrat: verbraucht 9,3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1280 g Triäthylaminchlorhydrat, 31,0%.

Über die chemischen Bestandteile grüner Pflanzen.

13. Mitteilung.

Über die flüchtigen basischen Stoffe grüner Pflanzen.

Von

Hartwig Franzen, Adolf Wagner und **Artur Schneider.**

(Aus dem chemischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe.)

(Eingegangen am 26. Januar 1921.)

Vor einiger Zeit[1]) konnte der eine von uns gemeinschaftlich mit Adolf Wagner zeigen, daß in den Blättern grüner Pflanzen allgemein ein Gemisch ungesättigter Alkohole vorkommt. Das seinerzeit untersuchte Pflanzenmaterial wurde gleichzeitig dazu benutzt, um einiges über die flüchtigen basischen Bestandteile der Pflanzen zu erfahren, vor allen Dingen, um zu sehen, ob es gelingt, mit so geringen Pflanzenmengen einzelne dieser Stoffe zu erkennen. Über die Verbreitung flüchtiger basischer Stoffe in den Pflanzen sind wir noch sehr schlecht unterrichtet; nur in einigen sind aliphatische Amine mit Sicherheit nachgewiesen worden, und auch über das Vorkommen von Ammoniak wissen wir noch recht wenig.

Das fein gehackte Pflanzenmaterial, 1 kg, wurde in Wasser aufgeschlämmt, und zunächst durch Wasserdampf die flüchtigen nichtbasischen Stoffe abgetrieben. Der Destillationsrückstand wurde dann unter Umschütteln mit Barytwasser bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt, und so lange durch den dicken Brei Wasserdampf hindurchgeleitet, bis das Destillat nicht mehr alkalisch reagierte. Es hatte bei allen Pflanzen den gleichen widerlichen Geruch. Das Destillat wurde mit $^{n}/_{10}$-HCl unter Zusatz von Methylrot als Anzeiger titriert.

---

[1]) Sitzungsberichte d. Heidelberger Akad. d. Wiss., Mathem.-naturwiss. Klasse, Abt. A, Jg. 1920. 2. Abh.

Die Menge verbrauchter $^n/_{10}$-HCl war bei den einzelnen Pflanzen die folgende:

Schöllkraut (Chelidonium majus)	52	ccm
Wein (Vitis vinifera)	88	„
Gelbe Rübe (Daucus carota)	19	„
Ackerwinde (Convolvulus arvensis). . . .	28	„
Erdbeere (Fragaria elatior)	21	„
Schlafmohn (Papaver somniferum) . . .	38	„
Rhabarber (Rheum raponticum)	146	„
Mauerpfeffer (Sedum acre)	37	„
Adlerfarn (Pteris aquilina)	59	„
Brennessel (Urtica dioica).	48	„
Wiesenrispengras (Poa pratensis)	41	„
Rhododendron	6	„
Spitzwegerich (Plantago lanceolata) . . .	20	„
Haselnuß (Corylus avellana)	14	„
Spitzahorn (Acer platanoides)	12	„
Birke (Betula alba)	13	„
Epheu (Hedera helix)	17	„
Georgine (Dahlia variabilis)	16	„
Wintereiche (Quercus sessiliflora)	5,5	„
Kälberkropf (Chaerophyllum silvestre) . .	23	„
Beinwell (Symphytum officinale)	25	„
Mangold (Beta vulgaris)	24	„
Sonnenblume (Helianthus annuus)	13	„
Pfefferminze (Mentha piperita)	22	„
Wolliger Schneeball (Viburnum lantana) .	5,5	„
Pyramidenpappel (Populus pyramidalis) .	7	„
Platane (Platanus vulgaris)	7	„
Heckenkirsche (Lonicera Xylosteum) . .	26	„

Aus den Versuchen folgt, daß in allen 28 untersuchten Pflanzen flüchtige basische Stoffe vorhanden sind, und da sie in keiner fehlen, darf man mit recht großer Sicherheit schließen, daß sie ein normaler Bestandteil aller grünen Pflanzen sind.

Die neutralisierten Destillate wurden auf ein kleines Volumen eingedampft und zunächst aufbewahrt, um später nach der in der vorhergehenden Mitteilung beschriebenen Methode analysiert zu werden. Zu diesem Zwecke wurde die Lösung der Chlorhydrate in einen Kjeldahlkolben gespült, die Flüssigkeit alkalisch gemacht, die Basen übergetrieben und in überschüssiger $^n/_{10}$-HCl aufgefangen. Die salzsaure Lösung wurde dann in einer tarierten Glasschale auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft, im Vakuumexsiccator über Kali und Schwefelsäure getrocknet und das Ge-

wicht des Salzrückstandes bestimmt. Dieser wurde in wenig Wasser gelöst, mit Quarzsand vermischt, das Ganze wieder im Vakuumexsiccator getrocknet, in eine Extraktionshülse gefüllt, diese nochmals 24 Stunden getrocknet und 4 Stunden im Soxhletapparat mit frisch destilliertem Chloroform extrahiert.

Der nach dem Abdestillieren des Chloroforms verbleibende geringe Rückstand wurde in Wasser gelöst und aus einem Kjeldahldestillationsapparat die Basen übergetrieben, in $^n/_{10}$-HCl aufgefangen und die nicht verbrauchte Salzsäure unter Zusatz von Methylrot als Anzeiger zurücktitriert. Die Basen wurden dann nochmals übergetrieben, in $^n/_{10}$-HCl aufgefangen, die Lösung zur Trockne eingedampft, der geringe Salzrückstand mit wenig Wasser aufgenommen, einige Tropfen der Lösung auf einem Objektträger mit Platinchloridlösung versetzt und die ausgeschiedenen Krystalle unter dem Mikroskop beobachtet. Gleichzeitig wurde dieselbe Reaktion mit Ammonchlorid, Dimethylamin- und Trimethylaminchlorhydrat angestellt. Chloroformauszug.

Der Inhalt der Extraktionshülse wurde nach dem Vertreiben des Chloroforms mit heißem Wasser ausgezogen, die wässerige Lösung nach Zusatz der nötigen Menge Natronlauge und Sodalösung 2 Stunden mit gelbem Quecksilberoxyd geschüttelt, die Quecksilberverbindungen abgesaugt und gewaschen. Der Filterrückstand wurde dann in einen Kjeldahlkolben gespült, Ameisensäure hinzugefügt, auf dem Wasserbade erwärmt, alkalisch gemacht, das Ammoniak übergetrieben, in $^n/_{10}$-HCl aufgefangen, titriert und dadurch die Menge des Ammoniaks bestimmt. Quecksilberrückstand.

Aus dem Filtrat vom Quecksilberrückstand wurden die Basen übergetrieben, in $^n/_{10}$-HCl aufgefangen und titriert. Sie wurden dann nochmals übergetrieben, in $^n/_{10}$-HCl aufgefangen, die Lösung der Chlorhydrate zur Trockne eingedampft, der Salzrückstand mit wenig Wasser aufgenommen, einige Tropfen mit Platinchloridlösung unter dem Mikroskop versetzt und die entstehenden Krystalle beobachtet; gleichzeitig wurde Ammonchlorid und Methylaminchlorhydrat in derselben Weise beobachtet.

Auf die eben beschriebene Weise wurde das alkalische Destillat der folgenden Pflanzen behandelt:

Wein (Vitis vinifera).
Chlorhydrate: 0,4300 g.

Chloroformauszug: 0,0011 g einer braunen, nicht krystallinen Substanz.

Quecksilberrückstand: verbraucht 74,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,3966 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 1,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0059 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Wilder Jasmin (Philadelphus coronarius).

Chlorhydrate: 0,7824 g aus 5 kg Blätter.

Chloroformauszug: 0,0008 g einer braunen, nicht krystallinen Substanz.

Quecksilberrückstand: verbraucht 137,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,7359 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 1,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0086 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Brennessel (Urtica dioica).

Chlorhydrate: 0,2100 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,05 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0003 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 32,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1718 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0027 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Spitzahorn (Acer platanoides).

Chlorhydrate: 0,072 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 11,6 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0629 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,3 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0016 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Platane (Platanus vulgaris).

Chlorhydrate: 0,0600 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 8,8 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0471 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Pfefferminze (Mentha piperita).

Chlorhydrate: 0,0450 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0005 g Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 5,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0297 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,25 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0013 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Wolliger Schneeball (Viburnum lantana).

Chlorhydrate: 0,0050 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

Quecksilberrückstand: verbraucht 0,7 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0037 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl.

Mangold (Beta vulgaris).

Chlorhydrate: 0,0110 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,05 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0003 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: keine Krystalle wahrnehmbar.

Quecksilberrückstand: verbraucht 1,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0064 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Rhododendron.

Chlorhydrate: 0,0370 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,05 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0003 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: keine Krystalle wahrnehmbar.

Quecksilberrückstand: verbraucht 5,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0267 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Beinwell (Symphytum officinale).

Chlorhydrate: 0,1220 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 19,95 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,1066 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0027 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammoniumchlorid.

Schlafmohn (Papaver somniferum).

Chlorhydrate: 0,2345 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,25 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0013 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 39,0 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,2085 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,5 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0027 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Schöllkraut (Chelidonium majus).

Chlorhydrate: 0,020 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,05 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0003 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 2,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0110 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Georgine (Dahlia variabilis).

Chlorhydrate: 0,0920 g.

Chloroformauszug: verbraucht 0,1 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0006 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Quecksilberrückstand: verbraucht 14,45 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0773 g Ammonchlorid.

Filtrat: verbraucht 0,2 ccm $^{n}/_{10}$-HCl, entsprechend 0,0011 g Ammonchlorid.

Mikroskopische Prüfung: Ammonchlorid.

Wie die Analysen zeigen, bestehen die flüchtigen basischen Stoffe der untersuchten Pflanzen im wesentlichen aus Ammoniak. In Chloroform lösliche und mit Quecksilberoxyd nicht reagierende Amine sind in ihnen höchstens in Spuren vorhanden. Um sie zu isolieren müssen jedenfalls erheblich größere Pflanzenmengen in Arbeit genommen werden.

Was wir über die Verbreitung des Ammoniaks in den Pflanzen wissen, ist, wie schon weiter oben gesagt, herzlich wenig. Wenn die bei Wehmer, „Die Pflanzenstoffe“ angegebenen Literaturstellen zugrunde gelegt und kritisch durchgesehen werden, so ist diese Base mit Sicherheit nur in den grünen Blättern der folgenden Pflanzen nachgewiesen worden:

Chenopodium vulvaria, Mercurialis annua, Daucus carota.

Die weiter oben angeführten Analysen zeigen, daß Ammoniak oder ein Ammoniak leicht abspaltender Stoff in den 13 untersuch-

ten Pflanzen vorhanden ist, und es dürfte wahrscheinlich sein, daß die flüchtigen basischen Bestandteile der anderen 15 Pflanzen im wesentlichen auch aus Ammoniak bestehen, so daß dieser Stoff wahrscheinlich ein normaler Bestandteil aller grünen Pflanzen ist. Weitere Untersuchungen über die flüchtigen basischen Bestandteile der grünen Pflanzen sollen mit größeren Materialmengen angestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich in folgende Sätze zusammenfassen:

1. In 28 untersuchten Pflanzen sind ausnahmslos flüchtige basische Stoffe vorhanden, so daß diese zu den normalen Bestandteilen grüner Pflanzen gehören dürften.

2. In 13 der untersuchten Pflanzen bestehen die flüchtigen basischen Stoffe im wesentlichen aus Ammoniak, so daß dieser Körper oder ein ihn leicht abspaltender Stoff weit verbreitet in den grünen Pflanzen ist und wahrscheinlich zu ihren normalen Bestandteilen gehört. Die Menge anderer flüchtiger basischer Stoffe tritt ihm gegenüber weit zurück.

Untersuchungen über Fällungsbedingungen der Wa.R.-Antigene (Herzextrakt).

Von

Rudolf Müller.

(Aus der serodiagnostischen Station der Klinik für Geschlechts- und Hautkrankheiten in Wien.)

(Eingegangen am 28. Januar 1921.)

Seitdem die Theorie der spezifischen Antigen-Antikörperreaktion bei der Wa.R. zugunsten einer Lipoid-Eiweißfällungsreaktion verlassen wurde, spielt die Frage der optimalen physikalischen Fällungsbedingungen des Antigens eine immer wichtigere Rolle. Wie ungemein abhängig der Reaktionsausfall von diesen Bedingungen ist, zeigt vor allem die vor Jahren von Sachs und Rondoni mitgeteilte Tatsache von dem Zusammenhang der Antigenwirkung und der Mischungsgeschwindigkeit des alkoholischen Stammextraktes mit Kochsalzlösung. Seit die von Porges gefundenen Präcipitationsreaktionen durch die von Sachs und Georgi, sowie Meinicke angegebenen Methoden neuerdings berechtigte Beachtung in theoretischer und klinischer Hinsicht gefunden haben, nimmt naturgemäß auch das Interesse an den Fällungsbedingungen des alkoholischen Herzextraktes in verstärktem Maße zu. Neben dem von Sachs und Rondoni gefundenen Gesetze spielt vor allem die Kochsalzkonzentration des Antigens, deren Wirkungen besonders von Meinicke[1]) in einigen Arbeiten von theoretischer und praktischer prinzipieller Wichtigkeit studiert wurden, eine maßgebende Rolle. Die Wirkung von Cholesterin bei den Fällungsvorgängen (Porges, Hermann und Perutz, Sachs) wurde in neuerer Zeit wieder von Sachs und Georgi eingehenderer Untersuchung unter-

[1]) Von den zahlreichen Publikationen Meinickes seien hier besonders die Arbeiten aus der Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **27**, H. 4 u. **28**, H. 3—4 hervorgehoben.

zogen. Relativ wenig Aufmerksamkeit dagegen wurde beim Studium der Fällungsvorgänge dem Lösungsmittel Alkohol bisher geschenkt. Ich gelangte nun in Verfolgung einer von mir gemachten Beobachtung über den Stabilitätsgrad des mit Kochsalzlösung gemischten Herzextraktes zur Kenntnis gesetzmäßiger Beziehungen zwischen dem Alkohol und den drei anderen beteiligten Faktoren: Kochsalz, Lipoid und Wasser, die vielleicht geeignet wären zur angestrebten gleichmäßigen, nach Gesetzen regelungsfähigen Antigenbereitung beizutragen. Jedenfalls halte ich die im folgenden mitgeteilten Befunde für geeignet, die Sachs-Rondonischen und Meinickeschen Angaben über die Dispersitätsveränderungen durch bestimmte Arten von Extraktverdünnung unserem Verständnis näherzubringen.

Zum Verständnis der folgenden Ausführungen will ich vorausschickend wiederholen, wie der von uns verwendete Herzextrakt („N"-Extrakt) bereitet wird: Der Rinderherzstammextrakt („C") (10 Herzbrei : 100 Alkohol) wird im Wasserbad zur Hälfte abgedampft und in heißem Zustand in etwas mehr als die doppelte Menge physiologischer Kochsalzlösung rasch eingegossen[1]).

Um mich zu überzeugen, wieviel aus den im Zimmer aufbewahrten watteverschlossenen, mit „N"-Extrakt beschickten Eprouvetten durch Verdunsten entweicht und welchen Einfluß dieser Verlust auf die Antigene ausübt, verschloß ich zum Vergleich eine zweite Reihe Eprouvetten mit Korkstöpsel, die mit Paraffin luftdicht gemacht wurden, während eine dritte Reihe unverschlossen gelassen wurde. Ich bemerkte nun, daß aus den beiden nicht mit Kork verschlossenen Eprouvetten schon nach wenigen Tagen eine erhebliche Menge Flüssigkeit verdunstet war, ohne daß jedoch im kolloidalen Aussehen der Mischung eine nennenswerte Änderung eingetreten wäre. Überraschenderweise war dagegen die Mischung in der luftdicht verschlossenen Eprouvette — wo natürlich keine Volumsveränderung eingetreten war — deutlich ausgeflockt. Wiederholungen des Versuches zeigten dasselbe Ergebnis. Diese Erscheinung war nicht ohne weiteres erklärlich. Es war von vornherein eher anzunehmen gewesen, daß in der offenen Eprouvette zuerst Flockung eintritt, da ja hier einerseits das Lösungsmittel, der Alkohol, in recht beträchtlicher Weise

[1]) Näheres in „Serodiagnose der Lues" von Rudolf Müller. Urban & Schwarzenberg 1913.

vermindert wurde und andererseits das Kochsalz, das bekanntlich fällende Wirkung auf Lipoide ausübt, durch die Verdunstung der Wasser-Alkoholmenge relativ vermehrt wurde. Und gerade der entgegengesetzte Effekt war eingetreten! Ich gelangte zu folgender Überlegung: Die verwendete Kochsalzmenge genügte jedenfalls zur Lipoidfällung, was durch das Ergebnis in dem verschlossenen Röhrchen erwiesen war. Wenn es gerade im offenen Röhrchen trotz der hier höheren Kochsalzkonzentration nicht zur Lipoidfällung kam, so konnte die Ursache darin gelegen sein, daß hier Wasser und Alkohol nicht in den Mengen oder in dem Verhältnis zueinander vorhanden waren, wie dies zum Vorgange der Ausfällung bei der gegebenen Salzmenge notwendig zu sein scheint. Da aber von dem leichter verdunstenden Alkohol ein größerer Teil abgedampft sein mußte als vom Wasser (das nur in etwa doppelter Menge vorhanden war), so gelangte ich zur Konklusion, daß bei der Fällung von Lipoid durch eine bestimmte Kochsalzkonzentration die Menge des in der Lösung vorhandenen Alkohols eine wichtige Rolle spielen müsse. Entsprechende Versuche überzeugten mich von der Richtigkeit meiner Vermutung, **daß die Fähigkeit einer bestimmten Kochsalzmenge, kolloidal gelöstes Lipoid aus einer Wasser-Alkoholmischung auszufällen, von dem Verhältnis zwischen den Wasser- und Alkoholmengen der Flüssigkeit abhängt.**

Versuchsbeispiel 1 (Tabelle I): Mehrere Reihen Eprouvetten werden mit je 3 ccm Kochsalzlösung beschickt. Die Konzentration der Kochsalzlösung ist in den Röhrchen jeder einzelnen Reihe gleich, steigt jedoch in jeder der Reihen von 1‰ bis 20‰. Nun wird in die Röhrchen

Tabelle I.

Kochsalzlösung 3 ccm	Menge des zugesetzten „C"-Extraktes						Bemerkung
	1 ccm	1,5 ccm	2 ccm	3 ccm	5 ccm	8 ccm	
1‰	K	K	K	K	K (dicht)	Pr (langs.)	Ganz ähnliche Resultate wurden erzielt, wenn statt C „C $\frac{L}{2}$" verwendet wurde.
5‰	K	K	K	Pr	Pr	Pr	
9‰	K	K	Pr	Pr	Pr	Pr	
10‰	K	K (dicht)	Pr	Pr	Pr	Pr	
15‰	K	Pr	Pr	Pr	Pr	Pr	
20‰	Pr	Pr	Pr	Pr	Pr	Pr	

Die Buchstaben bezeichnen den physikalischen Zustand der Mischung. K = kolloidal, Pr = Präcipitation.

jeder Reihe unverdünnter alkoholischer Herzextrakt („C")[1]) langsam längs der Eprouvettenwand in ansteigender Menge (1—8 ccm) zugefügt. Die Mischung erfolgt nach Verschluß mit dem Finger durch zweimaliges Schwenken. Der Versuch wird wiederholt mit einem Extrakt, der nur die Hälfte Lipoid enthält $\left(C\,\frac{L}{2}\right)$. (Wir stellten diesen Extrakt vor dem Versuch durch Verdünnen einer Menge „C" mit gleicher Menge 96proz. Alkohol her.) Nach einiger Zeit wird abgelesen (Tabelle I).

Der Versuch zeigt, daß bei gleicher Menge Salzwasser von bestimmter Salzkonzentration, die mit einem gewissen Quantum Herzextrakt kolloidale Lösung gibt, eine Erhöhung der Extraktmenge zuerst zur dichteren Trübung und schließlich zur Präcipitation führt. Je konzentrierter die Salzlösung, ein desto geringeres Quantum Extrakt ist zur Präcipitation erforderlich. Schon die Tatsache, daß auch bei $C\,\frac{L}{2}$, also einem Extrakt mit der halben Lipoidmenge, die Präcipitation bei ungefähr demselben Verhältnis von Salz-Wasser-Alkohol eintritt, macht es wahrscheinlich, daß nicht etwa die mit der Erhöhung von Extrakt einhergehende Vermehrung der Lipoidmenge die Ursache der Lipoidfällung ist, daß diese vielmehr durch die größere Menge Alkohol hervorgerufen wird. Davon kann man sich übrigens weiterhin leicht überzeugen, wenn man in eine der Eprouvetten mit kolloidaler Lösung einige Tropfen Alkohol zusetzt. Es kommt bald zu dichter Trübung und schließlich zur Fällung.

Um die fällende Wirkung des Alkohols quantitativ zu bestimmen, stellten wir mehrere Versuche an, von denen wir hier einige Beispiele anführen wollen.

Versuchsbeispiel 2 (Tabelle II A und II B): Mehrere Eprouvetten werden mit je 2 ccm einer 1 proz. Kochsalzlösung beschickt. In eine Reihe der Eprouvetten wird je 1 ccm „C", in eine zweite Reihe je 1 ccm $C\,\frac{L}{2}$ in derselben Weise wie in Versuch 1 zugefügt und mit der Salzlösung durch Umkippen gemischt. Nun wird längs der Eprouvettenwand 96proz. Alkohol in ansteigender Menge zugefügt (0,05—5,0). Es zeigt sich nun (Tabelle II A) in den mit „C" beschickten Eprouvetten, daß schon bei 0,05 Alkoholzusatz die Präcipitation aus der kolloidalen Lösung beginnt und daß die Ausfällung bei 0,1—1,0 komplett ist. Bei weiterer Erhöhung des Alkohol-

[1]) Der „C"-Extrakt wird, wie schon kurz erwähnt, folgendermaßen bereitet: 10 g feinzerhacktes Rinderherz werden durch 100 ccm 96proz. Alkohol bei 56° durch 24 Stunden extrahiert und nach Abkühlung bei Zimmertemperatur filtriert.

zusatzes wird die Fällung inkomplett, es tritt bei 3 ccm zarte Suspension ein, ohne daß die Teilchen zu Boden sinken, bei 5 ccm zeigt sich nur mehr zarteste Trübung. Im Parallelversuch mit C $\frac{L}{2}$ setzt die Präcipitation schon bei 0,05 komplett ein, dagegen führt schon ein geringerer Überschuß von Alkohol wieder zur Lösung. Bei 5 ccm Alkoholzusatz ähnelt die Lösung an Klarheit dem unverdünnten „C"-Extrakt. Ein ähnliches Ergebnis zeigt Tabelle II B, wo der vermehrten Salzwassermenge (4 ccm) entsprechend erhöhter Alkoholzusatz zur Fällung nötig war. Auch hier beginnt die Fällung am Parallelversuch mit C $\frac{L}{2}$ schon bei geringerem Alkoholzusatz, dagegen kommt es auch, wie im früheren Versuch 2, schon bei geringerem Alkoholüberschuß wieder zur Lösung. Die Versuche lassen sich natürlich in beliebiger Weise variieren.

Tabelle II A.

Ergebnis X	X	Alkohol	Y	Ergebnis Y
Kolloidal	C 1 ccm +NaCl 1%, 2 ccm	0	C $\frac{L}{2}$ 1 ccm +NaCl 1%, 2 ccm	kolloidal
Teilweise kolloidal .	"	0,05	"	Trübung und Ausfällung
	"	0,1	"	
	"	0,15	"	
	"	0,2	"	
Trübung und Ausfällung	"	0,3	"	
	"	0,35	"	
	"	0,4	"	
	"	0,45	"	
	"	0,5	"	
	"	1,0	"	Suspens. in Schwebe
Suspens. in Schwebe	"	3,0	"	zartest trüb
Zartest trüb . . .	"	5,0	"	klar

Tabelle II B.

Ergebnis A	A	Alkohol	B	Ergebnis B
Zart kolloidal . .	C 1 ccm +NaCl 1%, 4 ccm	0	C $\frac{L}{2}$ 1 ccm +NaCl 1%, 4 ccm	zart kolloidal
	"	0,1	"	
	"	0,4	"	
	"	0,5	"	teilweise präcip.
Teilweise präcip. .	"	0,7	"	ausgeflockt
Ausgeflockt . . .	"	1,0	"	
	"	2,0	"	
	"	3,0	"	teils koll., teils pr.
Teils koll., teils pr.	"	5,0	"	zart getrübt
Zart getrübt . . .	"	10,0	"	klar

Das Resultat ist immer eindeutig: Lipoid wird aus einer kolloidalen Lösung, die durch Mischung von alkoholischem Herzextrakt und entsprechender Menge Kochsalzlösung entsteht, durch geeigneten Alkoholzusatz zur Ausfällung gebracht.

Die frappantesten Resultate erhält man, wie erwähnt, durch Vergleich von luftdicht verschlossenen und offen gelassenen, mit kolloidalem Extrakt beschickten Röhrchen. Natürlich muß das Verhältnis zwischen Alkohol und Wasser annähernd richtig getroffen sein. Man erhält z. B. mit den meisten „N"-Extrakten in einigen Tagen das beschriebene Resultat. Man darf aber mit dem Abdampfen nicht zu nahe jener Grenze gehen, wo das Lipoid auch in siedendem Zustand nicht mehr klar im Alkohol gelöst ist. Es ist natürlich, daß mit so stark eingeengtem Extrakt hergestellte kolloidale „N"-Lösungen bei geringster Abnahme des Alkohols präcipitieren werden, und es käme dann das umgekehrte Ergebnis zustande: In dem offen gelassenen Röhrchen kommt es zur Präcipitation, während das geschlossene Röhrchen wegen der geringen Alkoholmenge recht stabil ist. Tatsächlich konnten wir auch solche Ergebnisse durch genügendes Einengen des „C"-Extraktes erzielen.

Im Hinblick auf die hier beschriebenen Gesetzmäßigkeiten gingen wir daran, das von Sachs und Rondoni zuerst beschriebene Phänomen der stärkeren Trübung und meist erhöhten Antigenwirksamkeit langsam bereiteter Extraktverdünnungen einer genaueren Analyse zu unterziehen. War doch anzunehmen, daß hier neben der in der Kolloidchemie schon bekannten Einwirkung der Mischungsgeschwindigkeit auf die Dispersionsart auch der besondere Einfluß des Alkohols eine Rolle spielen dürfte. Außer der Mischungsgeschwindigkeit ist es für das Aussehen und die Wirksamkeit der Mischung auch von Bedeutung, ob man den alkoholischen Extrakt zur Salzlösung gießt oder umgekehrt. Auch diese Differenz findet durch unsere Befunde eine Erklärung.

Setzt man Salzlösung zu Herzextrakt langsam zu, ist nach dem Gesagten eine dicht kolloidale Lösung aus folgendem Grunde zu erwarten. Durch den langsam sich abspielenden Vorgang des Zusetzens muß sich zu einem bestimmten Zeitpunkt wegen des in diesem Moment vorhandenen entsprechenden Überschusses von Alkohol eine länger dauernde dichte Trübung oder bei entsprechend verminderter Geschwindigkeit des Vorganges auch völlige Präcipitation ergeben, die sich zwar durch weiteren Salzwasserzusatz wieder bis zu einem gewissen Grade aufhellt, aber immerhin zu dem Effekt einer dicht kolloidalen Lösung führt.

Wird die Mischung sehr rasch (durch Einblasen) ausgeführt, dann kommt es gar nicht zur dichten Trübung oder Präcipitation; dieses Stadium des relativen Alkoholüberschusses wird förmlich übersprungen und daher resultiert eine ganz zart durchscheinende Lösung.

Deutliche Differenzen zwischen rasch und langsam bereiteter Mischung beobachtet man nur bei entsprechender Salzwassermenge, z. B. 3—4 ccm Salzwasser zu 1 ccm Herzextrakt. Gehe ich mit der zur Verdünnung benützten Salzwassermenge herunter, dann wird (z. B. bei 2 oder $1^1/_2$ ccm Salzwasser : 1 ccm Herzextrakt) der Unterschied zwischen langsam und rasch bereiteter Lösung deshalb ein geringerer, weil die hier auch nach beendeter Mischung vorhandene relativ große Alkoholmenge auch bei der rasch bereiteten Lösung zur dichten Trübung führt. Bei 1 ccm Salzwasser in 1 ccm „C" fällt jeder Unterschied weg, da es auch bei rasch bereiteter Lösung bald zu völliger Präcipitation kommt. Nach unseren Ergebnissen war es auch zu erwarten, daß bei Zusatz von Extrakt zu Kochsalzlösung die Differenz zwischen langsamer und rascher Bereitung eine geringe ist, da bei einem gewissen Salzwasserüberschuß (z. B. 1 ccm Extrakt zu 3 ccm Salzwasser) überhaupt nur relativ geringe Trübung auch bei langsamem Extraktzusatz auftreten kann. Denn zu keinem Zeitpunkt ist bei dieser Bereitungsart der Alkohol in entsprechendem Überschuß, der zur Fällung des größten Teiles der vorhandenen Lipoidmenge führt, wie bei der früher besprochenen Bereitungsart, wo wir die Salzlösung zum Extrakte zusetzten. Wenn trotzdem eine um geringes stärkere Trübung bei langsamer Bereitungsart eintritt, ist die Ursache darin zu suchen, daß sich — wie man sich leicht durch Augenschein überzeugen kann — bei langsamem Zufließen von Extrakt auf der Trennungsfläche zwischen Salzlösung und Extrakt eine zarte Präcipitationsscheibe ausbildet, da hier und nur hier an der Trennungsfläche nach Zusatz geeigneter Extraktmenge der entsprechende Alkoholüberschuß vorhanden ist, der zur Lipoidfällung führt. Da jedoch nur die unterste Schicht des Extraktes, also nur ein kleiner Teil des gelösten Lipoids zur Fällung kommt, ist dann bei schließlichem Durchschütteln, wobei die wenigen entstandenen Präcipitate durch den Wasserüberschuß wieder zur kolloidalen Lösung kommen, die Trübung eine nur geringe. Um ein weniges kann man die Trübung verstärken, wenn man fraktioniert verdünnt, d. h. nach Entstehen des Präcipitationsringes schüttelt und dann den Rest des Extraktes wieder langsam nachgießt. Es bildet sich dann ein zweiter, wenn auch weniger dichter Präcipitationsring. Es lassen sich demnach die wichtigen von Sachs und Rondoni beschriebenen Gesetze von der Abhängigkeit des physikalischen Zustandes von der Mischungsart durch die hier mitgeteilte Rolle des Alkohols erklären.

Die theoretische Erklärung der von uns gefundenen Tatsachen macht deshalb gewisse Schwierigkeiten, weil über den physikalischen Zustand des in Alkohol gelösten Lipoids noch nicht genügend Klarheit herrscht. Wir nehmen an, daß hier eine echte krystalloide

Lösung vorliegt, die erst nach Salzwasserzusatz zur kolloidalen Lösung wird. Die Teilchengröße und Stabilität der kolloidalen Lipoidlösung steht in direktem Verhältnis zur Wassermenge und ist zur Salz- und Alkoholmenge indirekt proportional. (Doch führt ein bedeutender Überschuß von Alkohol wieder zur krystalloiden Lösung, ebenso wie ja eine gewisse Wassermenge nötig ist, um überhaupt in den kolloidalen Zustand überzuführen.) Die mit der Alkoholmenge einhergehende Stabilitätsabnahme der kolloidalen Lösung dürfte aus der durch Alkoholzusatz erniedrigten Oberflächenspannung des Dispersionsmittels zu erklären sein. Die Arbeiten von Krugt und Huyn, Róna und Freundlich und Berceller beweisen, daß oberflächenaktive, nicht ionisierte krystalloide Substanzen in wässeriger Lösung die fällende Wirkung von Ionen erhöhen. Es werden z. B. durch Zusatz von Alkohol auch solche kolloidale Goldlösungen geflockt, die sonst bei gleichem Elektrolytgehalt beständig sind (Farbenumschlag von Rot in Blau). Der Grad der zur Fällungswirkung notwendigen Salzmenge wird natürlich bei den weniger stabilen Lösungen ein niedrigerer sein, und so kommt es, daß — wie in Versuchsbeispiel I — eine um so geringere Salzkonzentration zur Fällung notwendig ist, je mehr Alkohol die Lösung enthält und — wie der Versuch II zeigt — bei gegebener Salzmenge Alkoholzusatz zur Lipoidfällung führt, bis der Alkoholzusatz so groß wird, daß wieder Lösung entsteht.

Die Annahme, daß die Oberflächenspannungserniedrigung als Ursache der „Alkoholfällung" in Betracht kommt, beweisen auch die Ergebnisse einiger Versuche über Präzipitation des Lipoids aus seiner kolloidalen Lösung durch einige Medien, die die Oberflächenspannung der Lösung in verschiedenem Grade beeinflussen. Wir setzten zu einigen Röhrchen der gleichen kolloidalen Lipoidlösung in verschiedenen Mengen Methylalkohol, Äthylalkohol, Aceton, Äther, Chloroform und sahen, wie Tabelle III zeigt, eine Fällungsbegünstigung, die dem Grade entsprach, wie diese Reagenzien die Oberflächenspannung erniedrigten. Während bei Methylalkohol mehrere Kubikzentimeter zur Ausfällung nötig waren, führte bei Äther und Chloroform schon die geringste Menge zur dichten Trübung resp. Fällung. (Bei der starken Wirkung z. B. von Chloroform mögen andere fällende Komponenten wohl auch beteiligt sein.)

Wie weit die hier mitgeteilte Rolle des Alkohols bei der Fällungsbereitschaft des Antigens von praktischer Bedeutung für die Antigenbereitung ist, sind wir zu untersuchen beschäftigt.

Tabelle III.

1% Salzlösung 4 ccm, Herzextrakt (C) 1 ccm.

Ausfall nach Zusatz von:					Menge des Zusatzes:
Methylalkohol	**Äthylalkohol**	**Aceton**	**Alkohol**	**Chloroform**	
θ	θ	S	+	++++Pr	0,2
θ	S?	+	++++Pr	Pr	0,4
θ	S?	+	Pr	Pr	0,6
θ	S?	++	Pr	Pr	0,9
S?? (Erst bei weiterem Zusatz von 1 ccm beginnt Trübung.)	+++ (Langsam Präcipitation)	++++Pr	Pr	Pr	1,2

Zeichenerklärung: Die Anzahl der + Zeichen bedeutet die Dichtezunahme der kolloidalen Lösung. (S = Spur, θ = keine sichtbare Veränderung.) Pr = nach rascher Dichtezunahme baldige Präcipitation.

Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan. IV.

Über die Melanoidinbildung bei der Säurehydrolyse von Proteinen und ihre Abhängigkeit von Tryptophankomplexen.

Von

Otto Fürth und **Fritz Lieben.**

(Aus der chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Univ.-Inst.)

(Eingegangen am 29. Januar 1921.)

Wir haben kürzlich in dieser Zeitschrift[1]) über ein Verfahren berichtet, welches es gestattet, sich über die Menge des in einem Proteine enthaltenen Tryptophans ein weit richtigeres Urteil zu bilden, als dies bisher möglich war und es lag der Wunsch nahe, dieses Verfahren auch einer Klärung des so undurchsichtigen Melanoidinproblems zustatten kommen zu lassen.

Bekanntlich sieht man bei der Säurehydrolyse von Proteinen das Auftreten dunkelgefärbter amorpher Massen, die man als Melanoidine oder Huminsubstanzen bezeichnet hat und die offenbar sekundären Zersetzungsvorgängen ihre Entstehung verdanken. Man hat dieselben mit der Umwandlung cyclischer Komplexe im Eiweißmoleküle, vor allem des Tryptophans, sowie mit der Kohlenhydratgruppe der Proteine in Beziehung gebracht.

Bereits Nencki[2]) hatte den skatolliefernden Komplex, welcher bei der Pankreasverdauung die „Tryptophanreaktion" liefert, zu der Bildung melaninartiger Pigmente in Beziehung gebracht. Sodann hat Schmiedeberg[3]) die bei der Säurehydrolyse von Proteinen auftretenden dunkel gefärbten alkalilöslichen Substanzen als Melanoidinsäuren bezeichnet und ebenso (wie Chittenden und Albro[4])) einige derselben analysiert,

---

[1]) O. Fürth und E. Nobel, diese Zeitschr. **109**, 103. 1920; O. Fürth und F. Lieben, diese Zeitschr. **109**, 124 u. 153. 1920.

[2]) M. Nencki, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **28**, 567. 1895.

[3]) O. Schmiedeberg, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **39**, 65. 1897.

[4]) H. R. Chittenden und A. H. Albro, Amer. journ. of physiol. **2**, 291. 1899.

ohne daß die außerordentlich weit divergierenden Analysen eine wesentliche Aufklärung hätten bringen können.

F. Samuely[1]) hat einige Jahre später unter F. Hofmeisters Leitung die aus Eiweiß hervorgehenden melaninartigen Substanzen eingehend untersucht. Er lehnte die Meinung ab, daß die Bildung der Melanoidine allein oder auch nur der Hauptsache nach auf eine Umwandlung der Kohlenhydratgruppe des Eiweißes zu beziehen sei. Bilden doch auch kohlenhydratfreie Eiweißstoffe, wie Casein und Edestin, unter Säureeinwirkung Melanoidine. Man könne die Entstehung dieser letzteren ungezwungenerweise auf die Kondensation verschiedener cyclischer Komplexe (Pyrrol, Pyridin, Skatol, Tyrosin) beziehen.

Die Beobachtung, daß reines Tryptophan beim Kochen mit konz. Salzsäure keine melaninartigen Substanzen liefert, hat D. D. van Slyke[2]) zu der Annahme verleitet, das Tryptophan habe nichts mit der Melanoidinbildung zu tun.

Die Untersuchungen von R. A. Gortner[3]) und seiner Mitarbeiter haben diese Auffassung als irrtümlich erwiesen. Es ist richtig, daß, wenn man eine reine Tryptophanlösung mit Mineralsäure kocht, kein „Humin" entsteht (Gortner gebraucht den Ausdruck „Humine" für Melanoidine). Wohl aber tritt reichlich Humin auf, wenn neben dem Tryptophan noch ein Protein oder Kohlenhydrat[4]) vorhanden ist. Augenscheinlich stammt nach Gortner das Humin der Proteinhydrolyse aus dem Tryptophankerne und dürfte dabei die Kondensation eines Aldehyds mit der NH-Gruppe des Tryptophankernes eine Rolle spielen. Ist bei der Säureeinwirkung auf Tryptophan ein Überschuß von Kohlenhydrat als Aldehydquelle vorhanden, so findet sich nahezu 90% des Tryptophan-N in der Huminfraktion. Wird Fibrin bei Gegenwart von Furfurol, Benzaldehyd oder Formaldehyd hydrolysiert, so nimmt die Menge

---

[1]) F. Samuely (Physiol.-chem. Inst. Straßburg), Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 355. 1902.

[2]) D. D. van Slyke (Rockfeller Inst. New York), Journ. of biolog. Chem. **10**, 15. 1911.

[3]) R. A. Gortner und M. J. Blish, Journ. Amer. Chem. Soc. **37**, 1630; Chem. Centralbl. **2**, 616. 1915. — R. A. Gortner, Journ. of biolog. Chem. **26**, 177. 1917. — R. A. Gortner und G. E. Holm, Journ. Amer. Chem. Soc. **39**, 2477. 1917; Chem. Centralbl. 1918, S. 533. — Cornelia Kenedy und R. A. Gortner, Journ. Amer. Chem. Soc. **39**, 2734; Chem. Centralbl. **2**, 193. 1918. — R. A. Gortner und G. E. Holm, Journ. Amer. Chem. Soc. **42**, 632, 821. 1920; Chem. Centralbl. **3**, Nr. 13, S. 485. 1920.

[4]) Nach L. C. Maillard und Arm. Gautier (Compt. rend. **154**, 66. 1912) beobachtet man auch bereits die Bildung huminartiger Substanzen, wenn man Aminosäuren und Glucose unter gewissen Bedingungen in wässeriger Lösung bei Brutofenwärme aufeinander einwirken läßt. Angeblich soll es sich dabei um eine Abspaltung des CO_2 der Carboxylgruppe und um die Bildung von Ringen oder jedenfalls von doppelten Bindungen handeln.

des Humin-N erheblich zu (in letzterem Falle etwa auf das Anderthalbfache). Das Cystin und das Histidin sind an der Huminbildung ganz unbeteiligt. Zusatz von Tyrosin zur Eiweiß-Hydrolysenflüssigkeit fördert wesentlich die Huminbildung. Doch ist das dabei auftretende Humin durch seine Säurelöslichkeit von dem Tryptophan-Humin scharf unterschieden. Wird Tryptophan mit Formaldehyd in salzsaurer Lösung erhitzt, so geht ein erheblicher Teil seines N in die Form des säureunlöslichen Humin-N über. Wird ein Gemenge von Gelatine und Tryptophan bei Gegenwart von Formaldehyd hydrolysiert, so scheint das Maximum des säureunlöslichen Humin-N eng mit der Menge des Tryphans zusammenzuhängen.

Die neuesten Untersuchungen Gortners und seiner Mitarbeiter ergaben auf Grund der Untersuchung von 15 Aminosäuren, die mit und ohne Zusatz von Formaldehyd anhaltend mit 20proz. Salzsäure gekocht wurden, daß säureunlösliches Humin aus Tryptophan, säurelösliches Humin aus dem Tyrosin abstammt.

Die Möglichkeit, die Menge des in einem Eiweißkörper enthaltenen Tryptophans quantitativ bestimmen zu können, gestattet uns nun, durch den Vergleich dieser Menge mit der Melanidinausbeute Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Auffassung zu gewinnen.

Es liegen in der Literatur einige Angaben darüber vor, ein wie großer Anteil des Gesamtstickstoffes bei der Hydrolyse als „Melanin-Stickstoff" zum Vorschein kommt.

So hat insbesondere D. D. van Slyke folgenden Vorgang eingehalten:

3 g des Proteins wurden 6—8 Stunden lang mit 10—20 Teilen HCl 20% hydrolysiert. Dann wurde auf 200 ccm verdünnt, 100 ccm Alkohol und eine Suspension von Calciumhydrat hinzugefügt und der Ammoniak abdestilliert. Dabei wird das ganze Melanin durch den ungelösten Kalk adsorbiert. Man filtriert diesen ab, kjeldahlisiert das Filter samt Inhalt und bringt den N als „Melanin-N" in Rechnung.

Dieser oder ein ähnlicher Vorgang ist später noch von einigen englischen und amerikanischen Autoren geübt worden, deren Resultate wir in der folgenden Tabelle zusammenstellen.

Wir haben uns dabei die Frage vorgelegt, ob ein Parallelismus zwischen Melanin-N und Tryptophangehalt eines Proteins tatsächlich bestehe.

Die Tabelle enthält für die einzelnen untersuchten Proteine (nebst dem Literaturzitat), wieviel Prozent einerseits vom Gesamt-N, andererseits vom Gewichte des Proteins der Melanin-N ausmache. Unter der vorläufigen Annahme, daß der Melanin-N im wesentlichen einer Umwandlung des Tryptophans

seine Entstehung verdanke, wurde der Melanin-Stickstoff einfach auf Tryptophan (mit einem N-Gehalte von 13,72%) umgerechnet. In der letzten Kolonne folgen schließlich die (unseren früheren Arbeiten entnommenen) direkt colorimetrisch ermittelten Werte für den Tryptophangehalt der betreffenden Proteine.

Tabelle I.

Proteine	Literaturangaben	Melanin-Stickstoff		Tryptophan in Proz. des Eiweißgewichtes	
		in Prozenten des Gesamt-N	in Prozenten des Eiweißgewichtes	aus dem Melanin-N berechnet (Tryptophan mit 13,72% N)	durch direkte colorimetr. Bestimmung ermittelt (Fürth, Lieben u. Nobel)
Gliadin	D. D. van Slyke, Journ. of biolog. Chem. 10, 15 (1911)	0,86	0,15	1,1	2,0
Edestin		1,98	0,37	2,7	3,0
Gelatine		Spuren	Spuren	Spuren	0
Fibrin		3,17	0,54	4,0	5,3
Hämocyanin		1,65	0,27	2,00	?
Heteroalbumose aus Fibrin	P. A. Levene, D. D. van Slyke u. F. J. Bernhard, Journ. of biolog. Chem. 10, 57 (1911)	2,75	0,45	3,3	5,3
Protoalbumose aus Fibrin		4,11	0,66	4,8	
Casein	W. W. Pratt-Pittom, Biochemical Journ. 8, 156 (1914)		0,29 (Mittelwert)	2,1	2,0
Eieralbumin			0,31	2,3	2,6
Casein	E. Crowther u. H. Raistrük, Biochemical Journ. 10, 434 (1916)	1,26	0,17	1,3	2,0
Lactalbumin		1,82	0,29	2,1	2,9
Albumin aus Pferdeserum	P. Hartley, Biochemical Journ. 8, 541 (1916)	0,95 (Mittelwert)	0,15	1,1	1,3
Globulin aus Pferdeserum		2,15 (Mittelwert)	0,34	2,5	4,4
Eieralbumin	C. Kenedy u. R. A. Gortner, Journ. Amer. Chem. Soc. 39, 2784	4,71	0,76	5,6	2,6

Wird mit einer reinen nicht allzu verdünnten Tryptophanlösung die Reaktion von Voisenet (Violettfärbung bei Zusatz von Formaldehyd und schwach nitrithaltiger konz. HCl) ausgeführt, so sieht man bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur häufig die Spontanabscheidung des gefärbten Kondensationsproduktes in Form dunkler Flocken. Stellt man dagegen die Reaktion mit der Lösung eines tryptophanhaltigen Eiweißkörpers an, so wird eine derartige Spontanabscheidung

in dem kolloidalen Medium in der Regel vermißt. Erwärmt man aber eine solche schönviolette Lösung, so schlägt diese Farbe in Braun um und schließlich scheidet sich das ursprünglich violette leichtlösliche Kondensationsprodukt als schwarzbraunes schwerlösliches „Melanoidin" ab. Wir sind geneigt, die Voisenetreaktion, welche offenbar nicht nur der Reaktion von Hopkins und derjenigen von Adamkiewicz, sondern auch derjenigen von Liebermann (Violettfärbung beim Kochen von Proteinen mit konzentrierter Salzsäure) wesensverwandt ist[1]), sozusagen als Vorstufe der Melanoidinbildung anzusehen.

Wir hatten also, wenn wir uns über die Melanoidinsubstanz orientieren wollten, die Wahl, ob wir die einfache Säurehydrolyse anwenden oder aber die Hydrolyse auf dem Umwege über die Voisenetreaktion vornehmen wollten.

Bei der einfachen Hydrolyse war der Vorgang einfach der, daß eine entsprechende Menge (z. B. 10 g) des Proteins mit der mehrfachen Menge konz. Salzsäure unter Rückflußkühlung am Siedebleche gekocht wurde. Sodann wurde der größte Teil der Salzsäure durch Eindampfen vertrieben, die mit Wasser verdünnte Lösung neutralisiert[2]), der nunmehr sich grobflockig abscheidende Melanoidinniederschlag auf einem gehärteten Filter gesammelt und sorgfältig mit Wasser ausgewaschen, schließlich möglichst ohne Verlust in ein gewogenes Schälchen gebracht, bei 110° getrocknet und als Rohmelanoidin gewogen.

Wenn wir dagegen den Umweg über die Voisenetreaktion eingeschlagen haben, war der Vorgang derart, daß wir eine Eiweißlösung, deren Tryptophangehalt durch eine Vorprobe festgestellt worden war, mit soviel Formol, konzentrierter Salzsäure und Natriumnitrit versetzten, als unseren früheren Erfahrungen gemäß zur Erzielung einer optimalen Voisenetreaktion erforderlich war. (Analog der Standardreaktion, wobei 2 ccm einer 0,1 proz. Tryptophanlösung etwa den Zusatz von 1 Tropfen Formaldehyd 2%, von 20 ccm konzentrierter Salzsäure und 12 Tropfen $NaNO_2$ 0,05% erfordern.) Wir stellten also eine Voisenetreaktion in großem Maßstabe an, unterwarfen sodann erst das salzsaure Reaktionsgemenge einer hydrolytischen Spaltung, um schließlich wie oben das Rohmelanoidin zur Wägung zu bringen.

---

[1]) Vgl. diesbezüglich O. Rosenheim, Biochemical Journ. 1, 233. 1906. — S. F. Acree, Amer. chem. journ. 37, 604. 1907. — E. Voisenet, Compt. rend. de l'Acad. des Sc. 166, 789. 1918; Chem. Centralbl. 2, 766. 1918.

[2]) Gortner unterscheidet säurelösliches und säureunlösliches Humin, das erstere soll vorwiegend dem Tyrosin und nur letzteres dem Tryptophan entstammen. Wir haben auf eine Trennung dieser beiden Fraktionen verzichtet, da man meist erst nach vollzogener Neutralisation eine gut filtrierbare Fällung der zunächst kolloidalen Melanoidine erzielt.

Die Resultate dieser Versuche sowie einiger Beobachtungen, welche kürzlich F. v. Hoefft[1]) in diesem Laboratorium in ähnlicher Weise ausgeführt hat, finden sich in einer Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

Beobachter	Material	Verarbeitung	Colorimetrisch ermittelter proz. Tryptophangehalt	Proz. Ausbeute an Melanoidin
Fürth u. Lieben	Eiweiß aus Pferdeserum	Einfache HCl-Hydrolyse	ca. 4,0	4,0
"	Fibrin (in NaF 2% autolysiert)	"	5,0	3,3
"	"	Voisenet Reaktion mit nachfolgender Hydrolyse	5,0	4,6
"	"	"	5,0	7,0
"	Trockenes Fibrin	Einfache Hydrolyse	5,3	7,0
"	Fibrinpeptonlösung	Voisenet Reaktion mit nachfolgender Hydrolyse	2,3	1,6
"	Schilddrüseneiweiß (alkalische Lösung)	"	1,6	0,8
"	Tryptophan, rein, Lösung in HCl	"	3,20	1,88
F. v. Hoefft	Fibrin	Einfache HCl-Hydrolyse	5,3	ca. 6
"	Bluteiweiß	"	2,5	$3^1/_2$
"	Keratin aus Hornspänen	"	1,2	–1
"	Gelatine	"	0	Spuren
"	Eieralbumin	"	2,6	–5

Überblicken wir nunmehr die Resultate, die in den beiden Tabellen I und II zusammengestellt sind, so ergibt sich etwa folgendes:

Derartige Versuche können naturgemäß insofern nicht als quantitativ gelten, als einerseits Verluste durch die Manipulationen, vor allem aber auch durch eine unvollständige Abscheidung der kolloidal suspendierten Melanoidine oder Humine nicht immer zu vermeiden sind; andererseits können den Melanoidinen anhaftende Aschenbestandteile eine allzu große Ausbeute vortäuschen. Eine beiläufige Orientierung über die tatsächliche Melanoidinausbeute ermöglichen sie aber immerhin.

[1]) F. v. Hoefft, diese Zeitschr. 104, 1. 1920.

Unsere Resultate widersprechen nicht der Annahme Gortners, daß der Tryptophangehalt eines Proteins in erster Linie für die Melanoidinbildung verantwortlich zu machen sei, und erscheint ein gewisser diesbezüglicher Zusammenhang unverkennbar. Der Parallelismus ist allerdings nicht so weitgehend, daß man etwa irgendwie daran denken könnte, eine Tryptophanbestimmungsmethode auf die Ermittlung der Melanoidinausbeute basieren zu können.

Es ist dies schon deswegen nicht möglich, weil offenbar auch die in einem Proteine enthaltenen Zuckerkomplexe bei der Melanoidinausbeute eine Rolle spielen können. Der Umstand, daß zum mindesten viele Eieralbuminpräparate sicherlich relativ große Glucosaminmengen einschließen, läßt die Tatsache ohne weiteres verständlich erscheinen, daß sowohl in dem Versuche von Kennedy und Gortner (Tabelle I) als in denjenigen von Hoefft das Eieralbumin etwa doppelt soviel Melanoidin geliefert hat, als seinem Tryptophangehalte angemessen erscheint.

Wir haben, um ein Urteil darüber zu gewinnen, inwieweit die an Proteine gebundenen Kohlenhydratkomplexe für die Melanoidinbzw. Huminbildung tatsächlich in Betracht kommen, Pseudomucinpräparate, die aus Ovarialcystenflüssigkeit durch Alkoholfällung gewonnen worden waren, der Salzsäurehydrolyse unterworfen. Dieselben enthielten nur Spuren Tryptophan und waren also für unsere Zwecke insofern günstig als die bei der Hydrolyse sich ergebende Melanoidin- (Humin-) Menge demnach nicht dem Tryptophan entstammen konnte. Bei einer Reihe von Versuchen mit einem derartigen Präparate wurde eine optimale Zuckerabspaltung von 11,7% bei genauer Einhaltung des Vorganges von C. Neuberg und F. Heymann[1]) durch $2^1/_2$stündiges Zerkochen mit verdünnter Bromwasserstoffsäure (25 ccm HBr, spez. Gew. 1,49 + 80 ccm H_2O) erzielt[2]). Die Huminausbeute nach sechsstündigem Zerkochen dieses Präparates mit rauchender Salzsäure betrug 4,9%, also weniger als die Hälfte des für die Huminbildung zur Verfügung stehenden Kohlenhydratvorrates. Wir waren also zur Erklärung der Huminausbeute nicht etwa gezwungen, die Beteiligung anderer Komplexe außer der Kohlenhydratgruppe (z. B. des Tyrosins oder Cystins) als wesentlich anzunehmen.

Zusammenfassung.

Wir können unsere gegenwärtigen Vorstellungen über das Wesen der Melanoidinbildung etwa folgendermaßen formulieren:

---

[1]) C. Neuberg und F. Heymann, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, 206. 1902.

[2]) Beim Erwärmen mit 3 proz. Salzsäure am Wasserbade wurden nach $^1/_2$, 1, $1^1/_2$, $2^1/_2$ Stunden Ausbeuten von 8,7, 8,7, 8,0, 8,0% reduzierenden Zuckers erzielt. Auch vorangehende 1 tägige Quellung in 10 proz. Natronlauge vermochte die Zuckerausbeute nicht zu verbessern.

Die bei der Säurehydrolyse von Proteinen auftretenden dunkelgefärbten säureunlöslichen Kondensationsprodukte sind im wesentlichen als Umwandlungsprodukte des Tryptophans („Melanoidine") anzusehen, denen sich, nach Maßgabe als Kohlenhydratkomplexe vorhanden sind, diesen entstammende Humine beimengen können. Die Beteiligung anderer Komplexe (z. B. des dem Tyrosin entstammenden säurelöslichen „Humins" von Gortner) dürfte nur eine nebensächliche Rolle spielen. Die Reaktion von Voisenet (Violettfärbung tryptophanhaltiger Proteine mit schwach nitrithaltiger konzentrierter Salzsäure und Formaldehyd) kann sozusagen als Vorstufe der Melanoidinbildung gelten, insofern bei der Säurehydrolyse das ursprünglich leicht lösliche violette Reaktionsprodukt sich schließlich als schwerlösliches „Melanoidin" abscheidet. Das Auftreten eines violettgefärbten Zwischenproduktes (Reaktion von Liebermann) ist auch unter gewissen Umständen bei der einfachen Säurehydrolyse bemerkbar und man wird vermuten dürfen, daß diese Reaktion bei der Eiweißhydrolyse mit dem Auftreten eines Aldehyds einserseits, von oxydativen Faktoren (welche die Nitritkomponente der Voisenetreaktion vertreten können) andererseits irgendwie zusammenhänge.

Es dürfte sich empfehlen, künftighin die Bezeichnung „Melanoidine" (im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden „Melaninen") für Umwandlungsprodukte des Tryptophans, die Benennung „Humine" dagegen für die Umwandlungsprodukte von Kohlenhydratkomplexen zu reservieren.

Colorimetrische Untersuchungen über das Tryptophan. V.

Zur Kenntnis der Proteine der Immunsera und ihres Tryptophangehaltes.

Von

Otto Fürth und **Fritz Lieben.**

(Aus der Chemischen Abteilung des Wiener Physiologischen Univ.-Inst.)

(Eingegangen am 29. Januar 1921.)

Das Problem der chemischen Eigenart der Immunkörper rückt trotz der Fülle der ihnen bereits gewidmeten Forschungsarbeit nur langsam von der Stelle. Nicht einmal die Frage ist jedem Zweifel entrückt, ob die Antitoxine als eiweißartige Substanzen zu betrachten seien. Hat doch Pröscher[1]) seinerzeit behauptet, eiweißfreies Diphtherieantitoxin gewonnen zu haben, und der Meinung Ausdruck gegeben, wir hätten in den Antitoxinen eine neue Klasse von Körpern vor uns, die sowohl in chemischer als physikalischer Richtung völlig unbekannt seien und die eine viel einfachere chemische Konstitution besitzen als die Eiweißkörper. Eine derartige Auffassung hat allerdings im ganzen wenig Anklang gefunden. So faßt z. B. C. Oppenheimer[2]) nach einer übersichtlichen Darlegung des Tatsachenmaterials seine Meinung dahin zusammen, „es unterliege keinem Zweifel mehr, daß es die Globuline sind, an die die antitoxische Funktion geknüpft sei. Man will sogar mehrfach beobachtet haben, daß antitoxische Sera einen größeren Reichtum an Globulinen aufweisen als normale".

Man ist im allgemeinen gewohnt, physiologisch oder pharmakologisch hochwirksame Substanzen im Bereiche der Derivate cyclischer Systeme zu suchen und es ist sicherlich eine wenn

---

[1]) Pröscher, Münch. med. Wochenschr. **49**, Nr. 28. 1902.

[2]) C. Oppenheimer, „Chemische Natur der Antitoxine" im Handb. d. Biochemie, 2. Bd., 1. Teil, S. 357—362. 1908.

auch nicht experimentell begründete, so doch immerhin naheliegende Vermutung, daß auch beim Aufbau der Antitoxine Ringsysteme irgendwelcher Art beteiligt sein dürften, wobei sich die Aufmerksamkeit naturgemäß in erster Linie den im Eiweißmolekül vorgebildeten cyclischen Komplexen zuwendet.

Angesichts der Möglichkeit, die Menge eines derartigen Komplexes, des Tryptophans, mit ausreichender Genauigkeit auswerten zu können, erschien es verlockend, hochwirksame antitoxische Sera in bezug auf ihren Tryptophangehalt mit normalem Serum zu vergleichen, weiterhin aber auch festzustellen, ob dieselben in bezug auf Menge und Tryptophangehalt der einzelnen abtrennbaren Eiweißfraktionen (Euglobulin, Pseudoglobulin, Albumin) irgendwelche auffallende Besonderheiten erkennen lassen.

Für die Beistellung hochwertiger antitoxischer Sera sind wir dem Universitätsinstitute für allgemeine und experimentelle Pathologie, insbesondere aber Herrn Prof. Dr. Ernst Pribram, zu besonderem Danke verpflichtet, und zwar gelangten Proben a) eines Antidiphtherieserums[1]), b) eines Antidysenterieserums[2]) (Kruse-Shiga), c) eines Antitetanusserums[3]) zur Untersuchung. Als Vergleichsobjekt gelangte überdies ein normales Pferdeserum zur Beobachtung.

Der Gang der Untersuchung mag durch ein Beispiel veranschaulicht werden.

Tetanusserum:

a) Kjeldahl 2 ccm: $\left.\begin{matrix}0{,}0252\\0{,}0252\end{matrix}\right\}$ g N, daher 100 ccm: 1,26 g N, entspricht (unter Vernachlässigung des Nicht-Protein-N) 1,26 · 6,25 = 7,88% Eiweiß.

b) Voisenetbestimmung (ausgeführt nach O. Fürth und E. Nobel, diese Zeitschr. 109, 111. 1920): Ergibt nach 5facher Verdünnung für das unverdünnte Serum einen Tryptophangehalt von 0,27%.

c) Bestimmung der Menge der Albumin- und Globulinfraktion: 2 Proben zu je 5 ccm wurden mit 20 ccm Wasser und 25 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt. Nach Stehen über Nacht wurde der Globulinniederschlag durch ein trockenes Filter abfiltriert. Vom Filtrat wurden

---

[1]) Bezeichnung: Serie 789, 600fach aus Flasche Nr. 1144 vom Pferde „Zins", Aderlaß am 26. II. 1919.

[2]) Bezeichnung: Serie 107, Flasche 2053 vom Pferde „Amalia", Aderlaß am 24. III. 1920.

[3]) Bezeichnung: Serie 2, 25fach aus Flasche 1883 vom Pferde „Drusus", Aderlaß am 23. IV. 1919.

40 ccm (entsprechend 4 ccm Serum) durch Aufkochen auskoaguliert; das Koagulum wurde abfiltriert und mit heißem Wasser sulfatfrei gewaschen; das Filter sodann kjeldahlisiert ergab $\left.\begin{matrix}0{,}0178\\0{,}0178\end{matrix}\right\}$ gN für 4 ccm Serum; daher 0,445 g N für 100 ccm Serum,

$$0{,}445 \cdot 6{,}25 = 2{,}78\% \text{ Albumin,}$$

daher 7,88 „
2,78 „
5,10% Globulin.

Bewertet man auf Grund früherer Bestimmungen (Fürth und Nobel, l. c. S. 115) den Tryptophangehalt der Albuminfraktion des Pferdeserums mit 1,3%, denjenigen der Globulinfraktion mit 4,4%, so ergibt sich:

In 100 ccm Serum 2,78 g Albumin · 0,013 = 0,036 g Tryptophan
5,10 g Globulin · 0,044 = 0,224 „ „
Summa 0,260 g Tryptophan.

Es sollte sonach das Serum dementsprechend 0,26% Tryptophan enthalten. In befriedigender Übereinstimmung hat die direkte Voisenet-bestimmung (s. o. b) 0,27% Tryptophan ergeben.

d) Bestimmung der Menge der Euglobulin- und Pseudoglobulinfraktion: 20 ccm Serum wurde mit 10 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt, der Euglobulinniederschlag nach halbtägigem Stehen durch ein trockenes Filter abfiltriert, mit $^1/_3$-gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, bei 90° getrocknet, auf dem Filter mit heißem Wasser sulfatfrei gewaschen und kjeldahlisiert.

Es ergab sich: 0,0428 g N, entsprechend 20 ccm Serum, daher 0,214 g N entsprechend 100 ccm Serum.

$$0{,}214 \cdot 6{,}25 = 1{,}34\% \text{ Euglobulin}$$

3,76 „ Pseudoglobulin
5,10% Gesamtglobulin.

e) Tryptophanbestimmung im Euglobulin und Pseudoglobulin: 20 ccm Serum wurden mit 100 ccm einer gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt und nach längerem Stehen durch ein trockenes Filter filtriert. A. Niederschlag (Euglobulin), B. Filtrat.

Der Niederschlag wurde mit $^1/_3$-gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, sodann vom Filter genommen, in Wasser gelöst, die Lösung aufgekocht, das Koagulum abfiltriert, sulfatfrei gewaschen, sodann in 30proz. Natronlauge gelöst (Bestimmung in diesem Falle verunglückt).

Das Filtrat B wurde mit 7 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der nunmehr ausfallende Pseudoglobulinniederschlag durch ein trockenes Filter abfiltriert, mit halbgesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, das Filter bei 90° getrocknet, mit heißem Wasser sulfatfrei gewaschen, das Eiweißkoagulum durch kurzdauerndes Erwärmen mit NaOH 30% in Lösung gebracht.

Von der Lösung ergaben Proben:

a) Voisenet 0,022% Tryptophan

b) Kjeldahl 5 ccm $\left.\begin{matrix}0{,}0053\\0{,}0053\end{matrix}\right\}$ g N

100 „ 0,106 g N

0,106 · 6,25 = 0,66% Eiweiß.

Wenn sonach eine 0,66 proz. Eiweißlösung 0,022% Tryptophan enthält, so entspricht dies einem Tryptophangehalt des Proteins von 3,3%.

Wir stellen unsere Resultate in folgender Tabelle zusammen:

	Serum				Bemerkungen
	Normal	Diphtherie	Dysenterie	Tetanus	
Gehalt des Serums an Gesamteiweiß %	6,69	9,87	7,93	7,88	Gehalt an Gesamteiweiß
Gehalt des Serums an Gesamtglobulin %	3,80	6,76	5,86 5,48	5,10	Nach Hammarsten (8. Aufl., S. 807) normales Pferdeblut 7,1%
Gehalt des Serums an Euglobulin %	1,56	2,50	2,14	1,34	Nach Joachim, Pflügers Arch. 93, 591
Gehalt des Serums an Pseudoglubulin %	2,24	4,56	3,72 3,34	3,76	Normales Pferdeserum 7,58%
Gehalt des Serums an Albumin %	2.89	3,18	2,07 2,45	2,78	Nach Immunisierung gegen Diphtherie 8,18%
Relation Albumin-Globulin	$\frac{43{,}2}{56{,}8}=\frac{1}{1{,}31}$	$\frac{31{,}5}{68{,}5}=\frac{1}{2{,}17}$	$\frac{26{,}1}{73{,}9}=\frac{1}{2{,}83}$	$\frac{35{,}3}{64{,}7}=\frac{1}{1{,}83}$	Relation Albumin-Globulin, vor Immunisierung $\frac{50{,}2}{49{,}8}=\frac{1}{1}$ nach Immunisierg. $\frac{37{,}0}{62{,}0}=\frac{1}{1{,}78}$
Tryptophangehalt des Serums %	0,23	0,28	0,28	0,27	Normal. Serum (Frühere Bestimmungen Fürth & Nobel l. c.), 0,27, 0,28, 0,21, 0,20%
Tryptophangehalt d. Gesamtproteine %	3,44	2,84	3,58	3,48	Normal. Pferdeserum Fürth & Nobel 3,98% l. c.
Tryptophangehalt d. Euglobulinfraktion %	4,17	5,20	4,20	—	
Tryptophangeh. d. Pseudoglobulinfraktion %	3,75	4,6	4,1	3,3	

Überblicken wir nunmehr unsere Resultate, so finden wir, was die Menge der Serumeiweißkörper betrifft, bei allen Immunseren eine nicht unerhebliche Steigerung der Gesamteiweißmenge gegenüber der Norm. Diese kommt im wesentlichen auf Kosten der Globuline, und zwar nicht der Euglobulin-, sondern vielmehr der Pseudoglobulinfraktion.

Dieser Befund steht im wesentlichen mit älteren Beobachtungen im Einklang. So haben Szonthag und Weltmann[1]) das Diphtherieantiserum eiweißreicher als normales Serum gefunden. W. Seng[2]) fand das Antitoxin an die Globulinfraktion gebunden: J. P. Atkinson[3]) hat das Diphtherieantitoxin als „eine Form des Globulins" angesprochen. Ernst P. Pick[4]) hat den Nachweis erbracht, daß das Diphtherie- ebenso wie das Tetanusantitoxin im Pferdeserum mit dem Pseudoglobulin ausfällt; dagegen haftet das erstere im Ziegenserum der Euglobulinfraktion an. J. Joachim[5]) fand bei Immunisierung von Pferden gegen Diphtherie eine Zunahme des Globulins, welche auf Kosten des Euglobulins kam. Neuerdings fanden K. F. Meyer, S. H. Hurwetz und L. Taussig[6]), daß bei der Antitoxinbildung gegen Diphtherie-, Tetanus- und Botulismustoxin die Globulinmenge des Serums zunimmt, daß aber zwischen Antitoxingehalt und Globulinvermehrung keine konstanten Beziehungen bestehen.

In bezug auf den prozentischen Tryptophangehalt der einzelnen Proteinfraktionen lassen sich unsere Befunde dahin zusammenfassen, daß bei den Immunseren keine außerhalb der Versuchsfehler fallende Abweichung gegenüber der Norm verzeichnet werden kann, und daß keinerlei Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß dem Tryptophankomplexe beim Immunisierungsvorgange etwa eine Ausnahmestellung gegenüber anderen Komplexen des Proteinmoleküles zukomme.

Zusammenfassung.

Der Immunisierungsvorgang beim Pferde gegenüber Diphtherie, Dysenterie und Tetanus geht mit einer Steigerung des Eiweißgehaltes des Blutserums einher, welcher auf Rechnung der Globuline, und zwar der Pseudoglobulinfraktion fällt. Der prozentische Tryptophangehalt der einzelnen Serumproteine erscheint gegenüber der Norm nicht in auffallender Weise verschoben, und es liegt kein Anhaltspunkt dafür vor, daß den Tryptophankomplexen beim Immunisierungsvorgange etwa eine bevorzugte Rolle zufalle.

[1]) F. Szonthag und Weltmann, Magyar Orv. Arch. 1898, S. 337.
[2]) W. Seng, Zeitschr. f. Hyg. 31, 513. 1899.
[3]) J. P. Atkinson, Journ. of experim. med. 5, 67. 1900.
[4]) Ernst P. Pick, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 1. 1902.
[5]) J. Joachim, Arch. f. d. ges. Physiol. 93, 591. 1903.
[6]) K. F. Meyer, S. H. Hurwetz und L. Taussig, Journ. of infectious diseases 22, 1; Jahresber. f. Tierchemie 1918, S. 712.

Über biologische Wirkungen proteinogener Amine.

Zugleich ein Beitrag zur Frage der Acetonitrilreaktion.

Von

O. Wuth.

(Aus der Deutschen Forschungsanstalt für Psychiatrie.)

(Eingegangen am 29. Januar 1921.)

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre waren darauf gerichtet, den Problemen der inneren Sekretion dadurch näherzutreten, indem sie sich die Isolierung der wirksamen Substanzen der verschiedenen innersekretorischen Produkte zum Ziele setzten. Erreicht worden ist dieses Ziel nur im Falle des Adrenalins. Im Vordergrunde des Interesses stehen derzeit die Forschungen über das wirksame Prinzip der Thyreoidea und der Hypophyse.

Auf letzterem Gebiet haben Fühner sowie Guggenheim bedeutende Fortschritte errungen; ihre Resultate scheinen auf Substanzen hinzuweisen, welche der Gruppe der biogenen Amine angehören, zu denen auch das Adrenalin zu zählen ist. Auch auf dem Gebiete der Thyreoideaforschungen weisen Ergebnisse auf Beziehungen zu den Aminen hin, und zwar namentlich dem Paraoxyphenyläthylamin und einzelner seiner Substitutionsprodukte[1]). Namentlich Abelin hat in dieser Richtung ausgedehnte Untersuchungen geführt. Er erzielte zunächst bei thyreoidektomierten Hunden durch Zufuhr von Aminen Steigerung des N-Stoffwechsels, vermehrte Harnausscheidung und Gewichtsabnahme, also Stoffwechseländerungen, wie sie auch nach Schilddrüsenzufuhr auftreten. In derselben Richtung weisen seine Versuche an Ratten, bei denen nach Zufuhr von proteinogenen Aminen eine Zunahme des O_2-Verbrauchs und der CO_2-Ausscheidung beobachtet wurde. Ferner fand Abelin analog der Schilddrüsenwirkung eine Veränderung des Glykogenvorrates der Leber bei Ratten nach parenteraler Zufuhr von Paraoxyphenyläthylamin und Phenyläthylamin. Endlich beobachtete dieser Autor eine der Schilddrüsenwirkung

[1]) Anmerkung bei Drucklegung: Nach Kendall ist das wirksame Prinzip der Thyreoidea, das Thyreotoxin, dem Tryptophan nahestehend und jodhaltig; zu ähnlichen Resultaten war unabhängig von Kendall mündlichen Mitteilungen zufolge Romeis-München gelangt.

ähnliche Wachstumshemmung und Entwicklungsbeschleunigung bei metamorphosierenden Froschlarven durch Paraoxyphenyläthylamin und namentlich durch Dijodparaoxyphenyläthylamin. Zu ähnlichen Resultaten gelangte Adler, der bei Versuchen an winterschlafenden Igeln durch Zufuhr von Aminen eine der nach Thyreoidinzufuhr ähnliche Wirkung auf Atmung, Kreislauf und Schlafzustand des Tieres beobachten konnte.

Diese Resultate forderten zu weiteren Versuchen in dieser Richtung heraus.

Bekanntlich hat uns nun Reid Hunt eine Methode an die Hand gegeben, um selbst minimalste Mengen wirksamer Thyreoideasubstanzen nachzuweisen. Seine Methode ist eine biologische. Sie beruht auf der Tatsache, daß weiße Mäuse gegen Morphin sowie gegen Acetonitril eine bestimmte Empfindlichkeit haben, die durch perorale Thyreoidinzufuhr gegenüber dem Morphin erhöht, gegenüber dem Acetonitril herabgesetzt wird, d. h. also: Mäuse, die einer bestimmten Dosis Acetonitril pro Gramm Maus prompt erliegen, vertragen nach Zufuhr von Schilddrüsenpräparaten die mehrfach tödliche Dosis. Reid Hunt wählte für seine Versuche das Acetonitril, weil die Grenzdosis bei diesem Gift schärfer als bei Morphin ist. Die Fütterung der Mäuse geschah nach der Ehrlichschen Cakesmethode, die Injektion des Acetonitrils erfolgte subcutan. Reid Hunt führte die Schutzwirkung darauf zurück, daß die Abspaltung der Methylgruppe des Acetonitrils (CH_3CN) verlangsamt und so die Blausäure langsamer frei wird; er schließt dies aus dem Umstande, daß bei erhöhter Toleranz gegenüber dem Acetonitril die Empfindlichkeit gegen Blausäure in unverminderter Weise bestehen bleibt.

Es ist nun einleuchtend, daß die wichtigste Vorbedingung für die Brauchbarkeit der Reaktion die Zuverlässigkeit der Grenzdosis des Acetonitrils sozusagen des „Totwerts" ist, d. h. also, daß keine Maus eine höhere Dosis als die ermittelte letale überlebt, keine Maus an subletaler Dosis zugrunde geht. Reid Hunt und Trendelenburg machten auf einige Vorbedingungen aufmerksam, und fordern für die Reaktion, daß die Mäuse einheitlicher Bezugsquelle entstammen und unter gleichen Bedingungen, besonders hinsichtlich der Nahrung gehalten werden. Die Grenzdosis zeigt ferner an verschiedenen Orten und verschiedenen Jahreszeiten verschiedene Werte (Reid Hunt, Washington 0,25 mg Acetonitril pro Gramm Maus, Trendelenburg - Freiburg i. Br. 0,8 mg; Ghedini - Wien 4,5 bis 5 mg). Nach Reid Hunt sowie nach Trendelenburg ist nun diese Vorbedingung restlos erfüllt und die Grenzdosis eine absolut scharfe. Zu entgegengesetzten Resultaten gelangt Port, der nach Versuchen an 67 Mäusen bereits normalerweise recht verschiedene Empfindlichkeit beobachtet hat und infolgedessen den Wert der Acetonitrilreaktion anzweifelt. Worauf diese Divergenz der Resultate zurückzuführen ist, ist mir nicht klar, zumal die anderen Autoren, die sich der Reaktion bedient haben, nichts über derartige Erfahrungen berichten. Die Portschen Versuche sind in den Monaten April bis November ausgeführt; dies ändert jedoch wohl nichts an ihren Resultaten, da auch bei den am gleichen Tage ausgeführten Ver-

suchen Mäuse subletalen Dosen erlagen oder mehrfach tödlich sein sollende Dosen überlebten. Vielleicht ist eine Beobachtung, die wir gemacht haben und die ich bisher nirgends erwähnt finde, von Interesse. Wir verwendeten ebenfalls Acetonitril-Kahlbaum. Wir machten nun die Beobachtung, daß das Acetonitril auch in unverdünntem Zustande und in verschlossenen Flaschen aufbewahrt von seiner Wirksamkeit einbüßte, so daß sich erhebliche Unterschiede ergaben bei Versuchen, die mit altem oder frisch bezogenem Acetonitril angestellt wurden. Es ist deshalb unbedingt zu fordern, daß zusammengehörige Versuche jeweils mit demselben Acetonitril angestellt werden.

Unsere Fragestellung ging nun dahin, ob analog der Wirkungsähnlichkeit zwischen Thyreoidin und biogenen Aminen bei anderen biologischen Versuchen sich auch bei der Acetonitrilreaktion Analogien zwischen der Wirkung des Thyreoidins und der der Amine (des Paraxyphenyläthylamins, des Dijodtyramins und des β-imidazolyläthylamins) feststellen lassen würden.

Zur Methodik ist folgendes zu bemerken. Die Mäuse entstammten derselben Zucht und wurden einige Wochen vor Beginn des Versuches gehalten und mit Weizen und Hanf ernährt. Das Acetonitril wurde von der Firma Kahlbaum bezogen, es wurde jedesmal vor Gebrauch mit frisch destillierten Wasser verdünnt. Der genauen Dosierungsmöglichkeit wegen sahen wir von der peroralen Zufuhr der Amine ab und spritzten sie in frisch destilliertem Wasser gelöst, den Mäusen unter die Rückenhaut ein. Bei Versuch 1 und 2 beobachteten wir an der Injektionsstelle und in deren Umgebung zunächst Haarausfall und dann eine starke Infiltration der Haut, die jedoch nicht ulcerierte und auch durch Aufbewahrung der Tiere im Dunkeln nicht beeinflußt wurde. Versuch 1 und 2 sind mit Tyramin angestellt, das uns in liebenswürdigster Weise von den Farbwerken Bayer, Elberfeld zur Verfügung gestellt worden war. Das in Versuch 3 verwendete Präparat verdanke ich der großen Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Guggenheim, Basel. Das Dijodtyramin ist in neutralen wässerigen Lösungsmitteln unlöslich. Wir haben es daher in Wasser suspendiert und subcutan injiziert, ein Umstand, der bei der Wertung der Versuche zu berücksichtigen ist.

Ich gebe nun unsere Versuchsprotokolle wieder, und zwar zunächst

Versuch 1: Mit Paraoxyphenyläthylaminchlorhydrat (Tyramin).

1. **Vorversuch:** Austitrierung des Tyraminchlorhydrats.

Fortlauf. Nr.	Gewicht der Maus g	Gesamtmenge des injizierten Oxyphenyls g	Resultat
1	16,8	0,05	tot nach 10 Stunden
2	17,2	0,025	lebt

Bemerkungen: Paraoxyphenyläthylaminchlorhydrat in 0,5 ccm Aq. dest. gelöst, Injektion subcutan.

2. **Vorversuch:** Austitrierung des Acetonitrils.

Fortlauf. Nr.	Gewicht der Maus g	Injiziertes Acetonitril (mg pro Maus)	Resultat
3	16,5	0,6	tot nach 6 Stunden
4	21,5	0,3	lebt
5	17,3	0,45	tot nach $1^1/_4$ Stunde
6	22,8	0,38	lebt
7	20,0	0,41	"
8	18,9	0,43	tot nach $2^1/_4$ Stunden

Bemerkung: Acetonitril in Aq. dest. unmittelbar vor subcutaner Injektion verdünnt, injizierte Flüssigkeitsmenge 0,5 ccm.

1. **Hauptversuch.**

Fortlauf-Nr.	Dauer der Behandlung	Gesamte Paraoxyphenylmenge in mg	Gewicht vor der Behandlung	Gewicht nach der Behandlung	Injizierte Acetonitrilmenge (mg pro Maus)	Resultat
9	22 Tage	81,3	17,2	16,2	0,86	lebt
10	9 "	104,5	15,4	13,85	1,72	"
11	12 "	125,0	18,0	15,0	1,29	"
12	12 "	151,0	20,0	17,05	2,58	tot nach 3 Stunden

Bemerkung: Paraoxyphenyl. gelöst in 0,5 ccm Aq. dest., in Dosen von 12,8—25,9 mg jeden 2. Tag eingespritzt.

In Vorversuch 1 wurde die zur Vorbehandlung geeignete Dosis Tyramin ermittelt.

Der 2. Vorversuch ergab, daß 0,43 mg Acetonitril pro Gramm Maus die Dosis letalis bildete und keine der Mäuse diese oder eine höhere Dosis ertrug und wiederum keine mit subletalen Dosen geimpfte Maus verendete. Der Versuch sprach somit eindeutig für die Verwertbarkeit der Reaktion, obwohl ich mir bewußt bin, daß die Versuchsreihe viel zu klein ist, um hierüber ein endgültiges Urteil zu fällen. Der

Hauptversuch zeigte, daß Mäuse durch Vorbehandlung mit Tyramin mindestens die dreifache tödliche Dosis Acetonitril ertrugen. Es hatte also die Vorbehandlung mit Tyramin den Mäusen einen ähnlichen Acetonitrilschutz verliehen, wie es nach Reid Hunt u. a. eine solche mit Thyreoidin tut. Eine Nebenbeobachtung sei hier erwähnt. Es ist dies die Tatsache, daß die Mäuse bei der Vorbehandlung mit Tyramin trotz reichlicher Nahrungsaufnahme eine starke Gewichtsabnahme zeigten, so z. B. verlor Maus 11 in 12 Tagen 3 g, bei einem Gewicht von 18 g, also $^1/_6$ ihres Gesamtgewichtes. Über die Gründe dieses Gewichtsverlustes vermag ich nichts zu sagen; ich kann nur der Vermutung Raum geben, daß es sich auch hier vielleicht um eine dem Thyreoidin ähnliche Wirkung handelt (Abelin). Trotzdem dieser erste Versuch absolut eindeutig ausgefallen war, wurde er zur Kontrolle wiederholt.

Versuch 2: Mit Paraoxyphenyläthylaminchlorhydrat.

Vorversuch: Austitrierung neuen Acetonitrils.

Fort-lauf. Nr.	Gewicht der Maus g	Injizierte Acetonitrilmenge (mg pro Maus)	Resultat
14	18,0	1,0	tot nach 2 Stunden
15	23,0	0,7	„ „ 24 „
16	21,0	0,65	lebt

Bemerkung: Acetonitril in Aq. dest. unmittelbar vor der Injektion verdünnt. Injizierte Flüssigkeitsmenge 0,5 ccm.

2. Hauptversuch.

Fort-lauf. Nr.	Dauer der Behandlung	Gesamtmenge des injizierten Paraoxyphenyl. mg	Gewicht vor der Behandlung	Gewicht nach der Behandlung	Injizierte Acetonitrilmenge (mg pro Maus)	Resultate
17	28 Tage	85	17,2	17,9	2,10	lebt
18	37 „	42	16,0	17,2	2,80	tot nach 4 Stunden
19	32 „	86	20,5	20,75	2,80	tot nach 6 Stunden
20	33 „	86	19,0	16,0	2,10	lebt

Bemerkungen: Bei 17, 19 und 20 wurden 3 mal 0,025 g, dann 0,001 g jeden zweiten Tag eingespritzt. Bei 18 einmal 0,025 g, dann 0,001 g.

Der Vorversuch zeigte, daß die tödliche Dosis Acetonitril größer war als die im Versuch 1 benötigte. Der Hauptversuch erwies wiederum in eindeutiger Weise, daß die mit Tyramin vor-

behandelten Mäuse die dreifache sicher tödliche Dosis vertragen. Auch in diesem Versuche zeigte eine Maus eine beträchtliche Gewichtsabnahme.

Obwohl nun diese beiden vorstehenden Versuche völlig übereinstimmend ausgefallen waren, so wurde doch noch ein weiterer Versuch angestellt, der zugleich die Frage anschneiden sollte, ob auch ein anderes Amin von ausgesprochener pharmakodynamischer Dignität, nämlich daß β-Imidazolyläthylamin im Acetonitrilversuche irgendwelche Wirkung zeigen würde, und ferner im Hinblick auf die Beobachtung Reid Hunt, daß die Höhe des Schutzes bei gleicher Menge verfütterter Drüsensubstanz dem Jodgehalt desselben parallel ging, zeigen sollte, ob mit jodierten Aminen — es wurde Dijodtyramin verwendet — sich der gleiche oder vielleicht auch ein höherer Schutz erzielen ließe als mit Tyramin.

Versuch 3: Mit Paraoxyphenyläthylaminchlorhydrat; β-Imidazolyläthylamin; Dijod-para-oxyphenyl-äthylaminchlorhydrat.

Vorversuch: Austitrierung des Acetonitrils.

Fortlauf. Nr.	Gewicht der Maus g	Injizierte Acetonitrilmenge (mg pro Maus)	Resultat
21	16,2	0,6	tot nach 8 Stunden
22	18,3	0,45	lebt
23	21,0	0,53	tot nach 10 Stunden
24	11,5	0,49	lebt

Bemerkung: Verwendet wurde neues Acetonitril.

3. Hauptversuch: a) Mit Paraoxyphenyläthylaminchlorhydrat.

Fortlauf. Nr.	Dauer der Behandlung	Gesamtmenge des injizierten Paraoxyphenyl. mg	Gewicht vor der Behandlung	Gewicht nach der Behandlung	Injiziertes Acetonitril (mg pro Maus)	Resultat
25	24 Tage	130,0	14,0	13,2	1,59	tot nach 10 Stunden
26	24 „	13,0	15,8	14,7	1,59	lebt
27	26 „	140,0	21,3	20,5	1,06	tot nach etwa 12 Std.
28	26 „	14,0	19,3	20,5	2,12	tot nach 2 Stunden
29	26 „	140,0	19,8	20,0	1,06	„ „ 1 Stunde
30	26 „	14,0	18,3	17,0	1,59	„ „ 1 „

Bemerkungen: Dosierung bei 25, 27 und 29 10 mg pro Einspritzung; bei 26, 28 und 30 je 1 mg.

3. Hauptversuch: b) Mit β-Imidazolyläthylamin.

Fortlauf. Nr.	Dauer der Behandlung	Gesamtmenge des injizierten Imidazolyl. mg	Gewicht vor der Behandlung	Gewicht nach der Behandlung	Injiziertes Azetonitril (mg pro Maus)	Resultat
31	13 Tage	4,0	16,0	15,2	1,59	tot nach 6 Stunden
32	24 „	8,0	18,0	18,0	1,06	„ „ 2 „
33	24 „	8,0	17,2	15,0	0,58	lebt

Bemerkungen: Dosierung 1—0,5 mg pro Einspritzung in 0,5 ccm Aq. dest. β-Imid. in angewandten Dosen in Vorversuch ungiftig.

3. Hauptversuch: c) Mit Dijodtyramin.

Fortlauf. Nr.	Dauer der Behandlung	Gesamtmenge des injizierten Dijodtyramins mg	Gewicht vor der Behandlung	Gewicht nach der Behandlung	Injiziertes Acetonitril (mg pro Maus)	Resultat
34	13 Tage	30	15,0	12,2	1,59	lebt
35	20 „	100	16,8	15,5	2,12	tot nach 48 Stunden
36	20 „	100	20,0	19,0	2,65	„ „ 1 Stunde

Bemerkungen: Dosierung etwa 10 mg Dijodtyramin in 0,5 ccm Aq. dest. suspendiert. Dijodtyramin in angewandten Dosen in Vorversuch ungiftig.

Zu Hauptversuch 3a ist nun folgendes zu bemerken. 3 von den 6 Mäusen waren mit relativ höheren Dosen, die übrigen mit relativ niedrigen Dosen Tyramin vorbehandelt, um zu sehen, ob die Intensität der Vorbehandlung einen nennenswerten Einfluß ausübe. Es ergab sich nun das auffallende Resultat, daß diese stärker vorbehandelten Mäuse nicht einmal gegen die doppelte tödliche Dosis geschützt waren. Von den übrigen Mäusen hat nur eine die dreifach tödliche Dosis ertragen. Die Tatsache, daß dieser Versuch nicht so klar ausfiel wie die beiden vorhergehenden, ist nicht ohne weiteres verständlich. Vielleicht ist der Umstand von Einfluß gewesen, daß wir gezwungen waren, neue Mäuse zu besorgen, welches Material uns nicht so einwandfrei erschien wie das frühere.

Versuch 3b und 3c können in aller Kürze besprochen werden. Sie waren lediglich als informatorische Versuche gedacht und sind in so kleinem Umfang angestellt, daß ihnen kein großes Gewicht beizumessen ist; außerdem läßt die Zufuhr des Dijodtyramins in suspendiertem Zustande kein Urteil über die Resorption und die damit über die wirklich aufgenommene Menge zu. Immerhin

läßt sich aus den Versuchen vielleicht so viel entnehmen, daß dem Dijodtyramin eine dem Paraoxyphenyläthylamin ähnliche, in Anbetracht der ungünstigen Resorption vielleicht sogar stärkere Schutzwirkung zukommt, während dem β-Imid. eine solche zu fehlen scheint.

Wir haben somit gesehen, daß es gelingt, Mäuse durch Zufuhr von Tyramin und Dijodtyramin gegen die mehrfach tödliche Dosis Acetonitril zu schützen. Wir wissen, daß es gelingt, einen ähnlichen Schutz zu erzielen durch Zufuhr von Schilddrüsensubstanz und Thyreoidin (Reid, Hunt), durch Zufuhr von Blut thyreoidektomierter Tiere (Trendelenburg). Ferner gelang es, eine Resistenzerhöhung bei Mäusen zu erzielen durch Blut von Basedowkranken (Reid, Hunt, Ghedini), sowie durch Blut von Kranken, die an chronischer Nephritis, Adipositas dolorosa, Diabetes, Schilddrüsenvergrößerung litten (Ghedini). Von uns mit Krankenblut psychisch Kranker angestellte Versuche haben bisher keine eindeutigen Versuche ergeben, werden jedoch fortgesetzt. Es scheinen somit die fast stets mit Störungen der innersekretorischen Organe vergesellschafteten Krankheitsprozesse zu sein, welche dem Blute die Fähigkeit geben, eine Schutzwirkung auszuüben. Über die Rolle der biogenen Amine im Chemismus der inneren Sekretion besteht noch keineswegs Klarheit. Weit entfernt, einzelne davon als wirksame Prinzipien innerer Sekrete anzusprechen, wozu wir durch das Adrenalin versucht werden könnten, möchten wir ihnen doch in Anbetracht der Arbeiten von Guggenheim, Abelin und Adler eine bedeutsame Rolle zusprechen. Und in diesem Sinne möchten wir auch vorliegende Versuche gewertet wissen, nämlich als Versuche mittels einer hierzu noch nicht angewandten Methode Wirkungsähnlichkeiten zwischen biogenen Aminen und innersekretorischen Produkten aufzudecken. Das Resultat unserer Versuche kann im Sinne der Versuche von Guggenheim, Abelin und Adler gewertet werden, insofern es nämlich meines Erachtens gelungen ist, auch vermittels der Acetonitrilreaktion eine Ähnlichkeit in der Wirkung des Tyramins und Thyreoidins nachzuweisen. In Anbetracht der durch die äußeren Verhältnisse bedingten geringen Zahl der eingestellten Versuchstiere wäre eine Nachprüfung an größerem Material erwünscht.

Zusammenfassung.

1. Die Acetonitrilreaktion hat sich in unseren, allerdings zahlenmäßig kleinen Versuchen bei Beobachtung der nötigen Kautelen als zuverlässig erwiesen.

2. Durch Tyramin- und Dijodtyraminzufuhr können Mäuse, ähnlich wie durch Thyreoidinzufuhr gegen die mehrfach tödliche Dosis Acetonitril geschützt werden.

3. β-Imidazolyläthylamin hat sich als wirkungslos erwiesen.

Literatur.

Abelin, diese Zeitschr. **93**, 128. 1919; **101**, 192. 1919. — Abelin und Jaffe, diese Zeitschr. **102**, 39 u. 58. 1920. — Adler, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **86**, 159. 1920. — Fühner, Münch. med. Wochenschr. 1912, S. 852; Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **1**, 397. 1913. — Ghedini, Wien. klin. Wochenschr. 1911, zit. nach Port. — Guggenheim, diese Zeitschr. **65**, 189. 1914; Biogene Amine. Berlin 1920, Springer. — Port, diese Zeitschr. **51**, 224. 1913. — Reid Hunt, Journ. of biol. chemistry **1905**, 1. — Reid Hunt, Journ. of the Amer. med. assoc. **49**, 240. 1907. — Reid Hunt, Journ. of the Amer. med. assoc. **49**, 1320. 1907; **51**, 1385. 1908. — Trendelenburg, diese Zeitschr. **29**, 396. 1910.

Die Bedeutung kolloidaler Nährlösungen für die Funktion des normalen, erschöpften und vergifteten Herzens.

Von

S. G. Zondek.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. Januar 1921.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Zur Ernährung des isolierten Froschherzens verwendet man jetzt allgemein die Ringersche Lösung, die NaCl, $CaCl_2$, KCl und $NaHCO_3$[1]) enthält. Zu dieser einfachen, chemisch genau definierten Lösung ist man erst auf Umwegen gelangt. So benutzte man zunächst zur Ernährung des Herzens Blut bzw. Serum, dann ein Gemisch von isotonischer Kochsalzlösung mit Blut oder Serum. Schließlich zeigte sich, daß die Blutbestandteile ganz fortgelassen und durch isovisköse Gummi-arabicum-Lösung ersetzt werden können. Die Folge war, daß man der viskösen Beschaffenheit des Blutes und des Gummi arabicums für Ernährung des Herzens eine große Bedeutung beimaß.

Locke hat 1895 auf die Bedeutung des Calciums hingewiesen, das einen Bestandteil des Gummi arabicum darstellt. Auch der Gehalt des Gummis an Kaliumionen, die für die Funktion des Herzens von großer Bedeutung sind, ist — wie aus den noch folgenden Analysen hervorgeht — ausreichend. Neuerdings finden sich in der Literatur Angaben, die sich auf den günstigen Einfluß von Gummi arabicum auf den Kreislauf beziehen. So konnte Kestner[2]) zeigen, daß bei frisch getöteten Hunden eine von der Aorta ausgehende Durchspülung des Körpers mit physiologischer Kochsalzlösung oder Ringer zu starken Ödemen der inneren Organe, so des Darmes und Pankreas führte. Die Ödembildung konnte jedoch verhindert werden, wenn der Kochsalzlösung 2—3% Gummi arabicum zugesetzt wurde. Die Viscosität dieser NaCl-Gummi-arabicum-Lösung ent-

[1]) Auf 1000 aq. dest. 6,0 NaCl, 0,1 (wasserfreies) $CaCl_2$, 0,075 KCl, 0,1 $NaHCO_3$.

[2]) Kestner, Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 66.

sprach etwa der des Serums. Auf Grund dieser Resultate empfiehlt K., in der Klinik für Injektions- bzw. Infusionszwecke nicht mehr die gewöhnliche physiologische Kochsalzlösung, sondern eine NaCl-Gummi-arabicum-Lösung zu verwenden. Auch Bayliss[1]) hebt die günstige Wirkung von Akaziengummi auf den Kreislauf hervor. Als Infusionsflüssigkeit benutzte er eine 0,9 proz. NaCl-Lösung, der 6% Gelatine oder 7% Gummi arabicum zugesetzt ist. Die Erfahrungen, die während des Krieges bei einer französischen Armee mit dieser Lösung gemacht wurden, sollen außerordentlich günstig gewesen sein. Im Tierexperiment konnte durch NaCl-Gummi-arabicumlösung ein Blutverlust bis zu fast 70% wieder ausgeglichen werden. Das Wesentliche in der Gummi-arabicum-Behandlung besteht nach Bayliss in der Zufuhr von kolloiden Stoffen. Darauf werde ich später noch genauer eingehen. Auch von dem Einfluß, den kolloide Körper auf Giftwirkungen ausüben, war in letzterer Zeit öfter die Rede. Man ging davon aus, daß es nicht gleichgültig wäre, ob ein Gift in einer rein wässerigen, also echten Lösung zugeführt würde, oder in einer Lösung, die durch bestimmte Beimengungen kolloiden Charakter annimmt. Löffler und Spiro[2]) prüften die Wirkung von Histamin und Adrenalin auf den Darm und fanden, daß die Intensität der Giftwirkung verschieden war, je nachdem das Gift in einer rein wässerigen Lösung dem Organ zugeführt wurde oder einer Lösung, die durch Zusatz von Gummi arabicum, Gelatine oder Traganth kolloidale Eigenschaften hatte. Aber auch bei den einzelnen kolloidalen Substanzen haben sich auffallende Unterschiede bemerkbar gemacht. Kestner sowie Bayliss haben die Kolloide, die sie ihren Lösungen zusetzten, als pharmakologisch indifferente Körper angesehen und sie gerade deshalb für geeignet gehalten, die Kolloideigenschaft des Blutes bzw. Serums zu ersetzen.

Daß die genannten Kolloide an sich aber ganz indifferent sind, stimmt nicht; denn sie alle enthalten wirksame anorganische Körper, wie Kalk, Magnesium und Kalium; so z. B. das Gummi arabicum, das aus den Calcium-, Magnesium- und Kaliumsalzen der Arabinsäure besteht. Bei der großen Bedeutung, die nach unserer heutigen Auffassung den anorganischen Ionen für die Funktion der Zelle und der Gewebe zukommt, legte ich bei meinen Untersuchungen das Hauptgewicht darauf, zu entscheiden, inwieweit die erzielte Wirkung den eigentlichen Kolloiden und ihrer Viscosität oder den anorganischen Beimengungen zuzuschreiben ist. Ich wählte zu meinen Untersuchungen das isolierte Froschherz, weil es ein außerordentlich empfindliches und für Funktionsuntersuchungen sehr geeignetes Präparat darstellt. Da mir viel daran gelegen war, die Ergebnisse auf eine möglichst

[1]) Bayliss, Journ. of pharmacol. a. exp. therapeut. **15**, Nr. 1. 1920.
[2]) Löffler und Spiro. Kolloidzschr. **26**. 1920.

breite Grundlage zu stellen, habe ich es für nötig gehalten, die Untersuchungen nicht nur auf normale, sondern auch geschädigte Herzen zu erstrecken. Die Fragestellung lautete etwa folgendermaßen: Hat eine Ringerlösung, die durch Zufuhr kolloider Körper eine bestimmte Viscosität erlangt hat, auf normale, erschöpfte und vergiftete Herzen eine andere Wirkung als gewöhnliche Ringerlösung?

Die Versuche wurden bei männlichen Landfröschen ausgeführt, deren Gewicht zwischen 30 und 50 g schwankte. Das Herz arbeitete an der Straubschen Kanüle; die Ernährungsflüssigkeit betrug stets $^1/_2$ ccm.

Als Kolloidzusatz zur Ringerlösung dienten verschiedene Körper, so Gummi arabicum, Gelatine, Traganth und lösliche Stärke. Agar konnte nicht benutzt werden, da die Lösungen zu schnell gelatinierten. Es wurde stets so viel von dem Kolloid zugesetzt, bis die Lösungen dem Serum isoviskös waren. Die Bestimmung der Viscosität erfolgte mit dem sehr einfachen und brauchbaren Ostwaldschen Viscosimeter. Die Zahlen, die ich bei den Viscositätsbestimmungen erhielt, glichen im großen und ganzen den von Trommsdorf[1]) angegebenen Werten. Die Sera der einzelnen Tiere haben eine verschiedene Viscosität. Die Unterschiede sind jedoch nicht sehr erheblich; im Durchschnitt beträgt der Viscositätsquotient $\left(\frac{\text{Kolloidlösung}}{\text{Aq. dest.}}\right)$ 1,6—1,7. Dem Serum isoviskös sind — wie ich festgestellt habe — 3 proz. Gummi-arabicum-Lösung (gelöst in Ringer) 1 proz. Gelatine, $1^1/_4$ proz. Stärke, $^1/_7$ proz. Traganth. Es fällt hierbei auf, daß die Lösung der einzelnen Kolloide einen ganz verschiedenen Grad von Viscosität zeigen.

Ihre Wirkung auf das normale, frisch präparierte Froschherz ist nicht die gleiche. Bei Austausch der gewöhnlichen Ringerlösung gegen Stärke oder Traganthlösungen treten keine Funktionsänderungen auf. Auch bei ständiger Ernährung mit diesen Kolloiden verhielt sich das Herz genau wie bei Ernährung mit Ringer. Dagegen zeigt das Herz bei Austausch der Ringerlösung gegen Gelatine und Gummi-arabicum-Lösungen sofort eine ziemlich beträchtliche Tonuszunahme (bei Gummi arabicum stärker als bei Gelatine). Die Fußpunkte und Spitzen der Herz-

[1]) Trommsdorf, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 45. 1901.

kurven steigen an; allmählich treten Rhythmusstörungen verschiedener Art auf; im späteren Stadium kann es vorübergehend auch zum Stillstand des Herzens kommen. An dem charakteristischen Aussehen der Kurven konnte man erkennen, daß sich die Funktionsstörungen des Herzens mit denen decken, die bei erhöhter Calciumzufuhr auftreten. Die Aschenanalysen haben uns von der Richtigkeit unserer Vermutung überzeugt.

Tabelle I.

Kolloid	Isovisk. Konzentr. %	Aschengehalt %	In 100 g CaCl$_2$ g	In 100 g KCl g	Gehalt der isovisk. Ringerlösung CaCl$_2$	Gehalt der isovisk. Ringerlösung KCl
Gummi arabicum	3	3	2,2	0,8	0,7 : 1000	0,24 : 1000
Gelatine	1	2	1,9	0,1	0,3 : 1000	0,085 : 1000
Traganth	$^1/_7$	2,8	2,1	0,6	0,13 : 1000	0,085 : 1000

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist bei der Gummi arabicum- und Gelatinelösung der Gehalt an Calciumionen stark erhöht (bei Gummi arabicum 0,7 statt 0,1 $CaCl_2$: 1000 Aq. dest., bei Gelatine 0,3 statt 0,1: 1000). Der Kaliumgehalt der Gummi-arabicum-Lösung ist etwas, der der Gelatine fast gar nicht erhöht. Beim Traganth, der infolge der außerordentlich hohen Viscosität seiner Lösung nur in ganz kleinen Mengen ($^1/_7$%) der Ringerlösung zugesetzt wird, spielt der Salzgehalt keine Rolle. Eine Ringerlösung, deren Calciumgehalt entsprechend der Gummi-arabicum- und der Gelatinelösung erhöht ist, verhält sich in ihrer Wirkung auf das Herz genau wie die Lösung der beiden Kolloide. Der viskösen Beschaffenheit der Ernährungsflüssigkeit kann demnach ein Einfluß auf das normale Herz nicht zugesprochen werden.

Um zu prüfen, wie sich erschöpfte Herzen gegenüber kolloidalen Ernährungsflüssigkeiten verhalten, wurde bei den Herzen während eines Zeitraumes von 1—2 Stunden die Ringerlösung sehr häufig (etwa im Abstand von 2—3 Minuten) gewechselt. Durch diese wiederholten Auswaschungen wird bekanntlich die Herzfunktion erheblich geschwächt. Die Hubhöhen nehmen stark ab, mitunter kommt es auch zu einem Stillstand in Diastole. Tauscht man nun in diesem Stadium die Ringerlösung gegen eine der genannten viskosen Lösungen aus, so zeigt sich folgendes: Durch Gummi arabicum, Gelatine und Stärke wird die Herz-

tätigkeit bedeutend gebessert. Falls vorher ein Stillstand des Herzens eingetreten war, wird derselbe meist in kurzer Zeit wieder aufgehoben. Entfernt man aber die Gummi- bzw. Gelatinelösung und ersetzt sie wieder durch gewöhnliche Ringerlösung, so zeigen sich wieder die Symptome des ermüdeten Herzens. Bei Stärke ist dies nicht der Fall. Die Wirkung hält hier ziemlich lange an. Durch Traganth läßt sich die Funktion des erschöpften Herzens gar nicht beeinflussen. Das zeigt schon, daß der Viscosität bzw. der kolloidalen Beschaffenheit der Nährlösung für die Erholung des erschöpften Herzens keine Bedeutung zukommen kann. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß mit einer calciumreichen Ringerlösung dasselbe wie mit Gummi bzw. Gelatine zu erreichen ist. Das Calcium wirkt in diesen Fällen auf den erschlafften Herzmuskel tonisierend. Der günstige Einfluß der Stärke ist wohl darauf zurückzuführen, daß dem erschöpften Herzen neues Nährmaterial zugeführt wird. Denn dieselbe Wirkung wie die der viskosen Stärkelösung zeigt auch eine 1 proz. Traubenzuckerlösung. Auch bei Austausch gegen Ringer hält die Zuckerwirkung an. In letzterer Zeit sind bekanntlich auch klinische Versuche mit Traubenzucker bei funktionsschwachen Herzen gemacht worden. Endgültige Resultate liegen meines Wissens jedoch noch nicht vor. Auch Serum vermag die Funktion des erschöpften Herzens sehr günstig zu beeinflussen. Dies hat auch O. Loewi[1]) nachweisen können. Für meine Untersuchungen diente menschliches Serum und Froschserum. Es wurde den Herzen entweder unverdünnt oder in einer Konzentration von 1 : 2 oder 1 : 3 zugesetzt. Die Konzentrationsunterschiede haben dabei keine Rolle gespielt. Wir wissen heute, daß zwischen Blut und Serum pharmakologisch große Unterschiede bestehen. Ich weise auf die Untersuchungen von O'Connor[2]) hin, der nachweisen konnte, daß Serum am Läwen-Trendelenburgschen Froschgefäßpräparat eine vasokonstriktorische Wirkung hat, Citratplasma dagegen nicht. Nach Abschluß meiner Untersuchungen sind neuerdings Arbeiten von Hermann Freund[3]) erschienen, der die pharmakologischen

[1]) O. Loewi, Arch f. d. ges. Physiol. 170, 677. 1918.

[2]) O'Connor, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 67, 195. 1912.

[3]) Freund, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 86, 284. 1920 und 88, 39. 1920.

Wirkungen des defibrinierten Blutes sowohl an Kalt- wie Warmblütlern studiert und dabei sehr interessante Beobachtungen gemacht hat. Er unterscheidet eine Frühgift- und eine Spätgiftwirkung. Das frisch defibrinierte Blut wirkt blutdruckherabsetzend, gefäßlähmend; nach einiger Zeit (schon nach 10 bis 15 Minuten) werden die Frühgifte durch die Spätgifte verdrängt. Die Spätgifte wirken gerade entgegengesetzt, also gefäßverengernd, blutdrucksteigernd, am Froschherzen digitalisähnlich. Außerdem konnte er zeigen, daß die pharmakologische Wirksamkeit des Serums nicht auf Blutveränderungen zurückzuführen ist, die allein durch den Gerinnungsakt entstehen, sondern daß die wirksamen Stoffe auch im Citratplasma nach Zerstörung der Blutplättchen auftreten. Isolierte und durch Wasser zerstörte Blutplättchen sollen dieselbe Wirkung entfalten. Uns interessiert hier hauptsächlich die Serumwirkung. Es unterliegt keinem Zweifel, daß die günstige Wirkung des Serums auf das erschöpfte und erschlaffte Herz auf seine kontraktionssteigernden Eigenschaften zurückzuführen ist. Da ich stets nur älteres Serum (1—2 Tage alt) untersucht habe, hat sich die schädliche Frühgiftwirkung niemals bemerkbar gemacht. Daß Serum auch durch Gifte geschädigte Herzen wieder günstig beeinflussen kann, habe ich in einer früheren Arbeit[1]) schon hervorgehoben; darauf werde ich später jedoch noch zurückkommen. Jedenfalls kann die Serumwirkung nicht auf die Viscosität zurückgeführt werden. Das ergibt sich nach den bisherigen Untersuchungen wohl von selbst.

Die Frage, ob für Giftwirkungen die Viscosität der Ernährungsflüssigkeit bzw. die des Lösungsmittels von Bedeutung ist, habe ich in folgender Weise zu klären versucht: Zunächst habe ich einzelne Gifte in Ringerlösung auf das Herz einwirken lassen und nach eingetretenem Erfolg untersucht, ob die Giftwirkung sich durch Auswaschung mit kolloidalen Lösungen schneller beseitigen läßt als durch Behandlung mit Ringer. Vergiftet wurden die Herzen mit Chloralhydrat oder Muscarin. Auswaschungen mit Traganth und Stärke haben die Giftwirkung nicht anders beeinflussen können als Ringer. Dagegen hat Gummi arabicum unter bestimmten Bedingungen die Giftwirkung

[1]) S. G. Zondek, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 87, 342. 1920.

sofort aufgehoben. Bei der Gelatine waren die Resultate nicht ganz eindeutig. In einer früheren Arbeit[1]) habe ich nachweisen können, daß Giftwirkungen am Herzen (auch Chloralhydrat und Muscarin), durch Calcium und Kalium sowohl in ihrer Art wie Intensität stark beeinflußt werden können. Zwischen einer calciumreichen Ringerlösung und Gummi arabicum bestehen nun nach dieser Richtung hin keinerlei Unterschiede. Deshalb ist es überflüssig, jetzt auf die Einzelheiten noch näher einzugehen. Daß die Gelatinelösung nicht immer zu einer deutlichen Wirkung führte, liegt wohl daran, daß ihr Calciumgehalt nicht so hoch ist wie der der Gummi-arabicum-Lösung. Wie schon vorhin erwähnt, vermag auch Serum die Wirkung einiger Gifte am Herzen aufzuheben, besonders dann, wenn einige Ringerauswaschungen erfolglos geblieben waren. Die Herzen können dann sofort ihre normale Funktion wieder erlangen. Natürlich gilt dies nicht für alle Gifte. Bei Chloralhydrat und Muscarin, die zwar einen verschiedenen Angriffspunkt haben, aber beide zu einem diastolischen Herzstillstand führen, ist die Wirkung sehr günstig; beim Strophantin dagegen, das zu einem systolischen Herzstillstand führt, ist der Erfolg ein anderer: die Strophantinwirkung wird durch Serum nicht aufgehoben oder abgeschwächt, sondern verstärkt und der Eintritt des Stillstandes beschleunigt. Freund[2]) hat bei Untersuchungen mit Serum und Gitalin die gleichen Beobachtungen gemacht. Die günstige Wirkung des Serums auf den diastolischen Chloralhydrat- und Muscarinstillstand dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die Kontraktionsfähigkeit der erschlafften Ventrikelmuskulatur durch die im Serum enthaltenen kontraktionssteigernden Substanzen wiederhergestellt wird[3]).

[1]) S. o.

[2]) A. a. O.

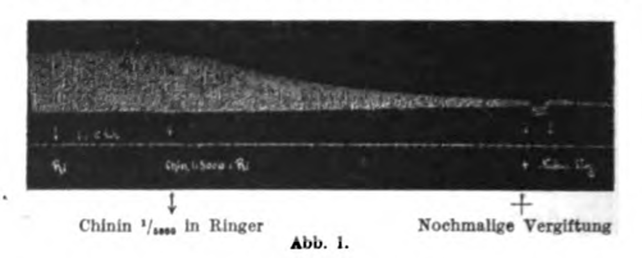
[3]) In einer während der Korrektur dieser Arbeit erschienenen Abhandlung von H. Wieland, Freiburg (Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 89, 46. 1921) wird auf die entgiftende Wirkung von Serum, Kampfer, Äther, Xylol, Natriumoleat, Tierkohle auf ermüdete bzw. mit Desoxycholsäure vergiftete Herzen hingewiesen. W. nimmt an, daß die entgiftenden Körper in der Weise wirken, daß sie an der Oberfläche des Herzens absorbiert werden und das dort gebundene Gift verdrängen. Was das Serum betrifft, scheint diese Auffassung jedenfalls nicht richtig zu sein; denn es ist dann unverständlich, weshalb die Wirkung von Digitalis bzw. Strophantia durch Serum noch gesteigert wird.

Bei den nächsten Versuchen ging ich von der Frage aus, wie Gifte wirken, wenn sie von Anfang an statt in Ringer in einer kolloidalen Lösung dem Herzen zugeführt werden. Wie anfangs erwähnt, haben Löffler und Spiro[1]) von diesem Gesichtspunkt aus die Wirkung von Histamin und Adrenalin auf den Darm geprüft und dabei festgestellt, daß die Kolloide die Giftwirkungen abschwächen. Dabei fiel ihnen auf, daß der Grad der Wirkung bei den einzelnen Kolloiden verschieden war. Eine Erklärung dafür konnten sie nicht geben. Für meine Untersuchungen an Herzen wählte ich als Gift das Chininum hydrochloricum, das bei einer Verdünnung von 1:5000 in Ringer einen diastolischen Herzstillstand innerhalb von 5—10 Minuten herbeiführt. Zur Herstellung der kolloidalen Lösungen diente auch hier wieder Gummi arabicum, Gelatine, Traganth und Stärke. Da ich früher schon nachweisen konnte[2]), daß auch die Chininwirkung am Herzen durch Calcium beeinflußt, ja sogar ganz aufgehoben werden kann, so war mir von vornherein klar, daß auch bei den Kolloidversuchen der Calciumgehalt der einzelnen Kolloide für den Wirkungsausschlag von großer Bedeutung sein muß. Die Kolloidlösungen wurden auch hier in den anfangs angegebenen Konzentrationen hergestellt, Der Chiningehalt der Kolloidlösungen entsprach — wie oben schon erwähnt — einer Konzentration von 1:5000. Die Ergebnisse waren folgende: Die Stärke und Traganthlösungen haben die Chininwirkung in gleicher Weise beeinflußt. Der Eintritt des diastolischen Herzstillstandes wurde zeitlich stark verzögert. Bei der Chinin-Ringervergiftung (Abb. 1) nahmen die Herzamplituden so schnell an Größe ab, daß schon nach 5—10 Minuten Ventrikelstillstand eintrat. Bei der Chinin-Stärke, bzw. Chinin-Traganthvergiftung dagegen war die Giftwirkung nicht so intensiv; die Herzamplituden wurden nur ganz allmählich kleiner, der Herzstillstand trat erst viel später ein. Bei steigender Viscosität des Lösungsmittels war die giftabschwächende Wirkung der Kolloidlösung gegenüber gewöhnlicher Ringerlösung noch deutlicher; so wirkte z. B. Chinin 1:5000 in einer 2 proz. Stärke-Ringerlösung (Viscositätsquotient V = 2,4) nicht stärker als Chinin 1:20 000 in Ringer. Daß die

[1]) A. a. O.

[2]) S. G. Zondek, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 88, 158. 1920.

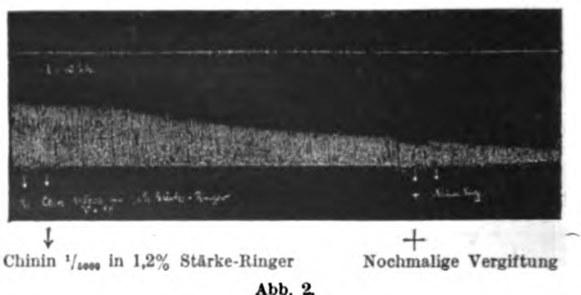
Wirkung des Chinins in der kolloidalen Lösung schwächer als in der Ringerlösung ist, stellt nichts Überraschendes dar; denn



Chinin $^1/_{5000}$ in Ringer — Nochmalige Vergiftung

Abb. 1.

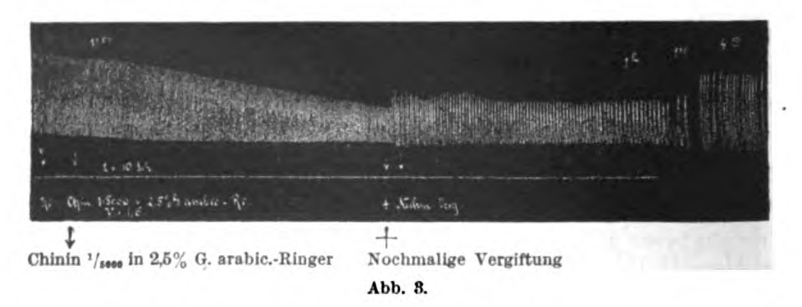
es ist leicht verständlich, daß die Resorption von Giften aus einer kolloidalen Lösung langsamer als aus einer echten Lösung erfolgen kann. Dazu kommt noch die Adsorptionswirkung des Kolloids



Chinin $^1/_{5000}$ in 1,2% Stärke-Ringer — Nochmalige Vergiftung

Abb. 2.

selbst. Der Stärke und dem Traganth kommt auf diese Weise etwa die Rolle eines Schutzkolloids zu (Abb. 2). Anders verhält es sich beim Gummi arabicum und bei der Gelatine. Sie hemmen



Chinin $^1/_{5000}$ in 2,5% G. arabic.-Ringer — Nochmalige Vergiftung

Abb. 3.

nicht nur die Giftwirkung, sondern können sie auch ganz aufheben. Bei der Chinin-Gummi-arabicumvergiftung arbeitet der Ventrikel selbst nach 24 Stunden noch kräftig (Abb. 3). Die

Gelatine wirkt in gleicher Weise wie das Gummi arabicum, jedoch etwas schwächer. Aus dem mitgeteilten Material ergibt sich eigentlich von selbst, daß hier wiederum der relativ hohe Calciumgehalt der Gummi-arabicum- und Gelatinelösung die ausschlaggebende Rolle spielt. Dazu kommt noch, daß ich — wie schon erwähnt — mit einer Ringerlösung, deren Calciumgehalt etwa dem der Gummilösung entsprach, ebenfalls die Chininwirkung (desgleichen auch die Arsenwirkung) aufheben konnte. Auch die typischen Rhythmusstörungen, die dem Calcium zuzuschreiben sind, fanden sich bei der Gummi- und Gelatinebehandlung. Trotzdem schien es mir noch angebracht, dieselben Versuche mit calciumfreiem Gummi arabicum, also mit der Arabinsäure selbst anzustellen. Zur Isolierung der Arabinsäure wurde eine konzentrierte Gummilösung mit HCl stark angesäuert und dann mit Alkohol gefällt. Der in Wasser lösliche Niederschlag wurde dann durch wiederholtes Fällen mit Alkohol allmählich vom Calcium befreit. Es ist empfehlenswert, evtl. noch zu dialysieren, um etwa zurückgebliebene anorganische Reste zu beseitigen. In der Tat hat, wie zu erwarten war, die Arabinsäurelösung, deren Viscosität der des echten Gummis entspricht, die Chiningiftwirkung nicht aufheben können. Die Wirkung der Arabinsäure entsprach der des Traganths.

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß für die Funktion des Froschherzens die Viscosität der Ernährungsflüssigkeit keine Bedeutung hat. Dasselbe gilt auch für erschöpfte und vergiftete Herzen. Sie erholen sich unter dem Einfluß einer Ernährungsflüssigkeit, die Kolloidcharakter hat, nicht besser als bei Ernährung mit gewöhnlicher Ringerlösung. Damit soll natürlich nicht behauptet werden, daß Kolloide überhaupt auf das Herz keine Wirkung haben; denn es ist ja bekannt, daß zwischen mehreren Kolloiden (die Herzzellen stellen ja auch Kolloidkörper dar), sehr intensive Reaktionen stattfinden können. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Verschiedenheiten in der elektrischen Ladung usw. Durch die vorliegenden Untersuchungen soll nur zum Ausdruck gebracht werden, daß für die Funktion des Herzens lediglich der kolloidale Charakter bzw. die von ihm abhängige Viscosität der Ernährungsflüssigkeit keine Bedeutung hat. Soweit bei dem Gummi arabicum, der Gelatine, Stärke und dem Traganth Wirkungen beobachtet wurden, waren sie nicht den eigentlichen

Kolloiden zuzuschreiben. Die Gummi- und Gelatinewirkung deckte sich mit der Kalkwirkung. Der Stärke kommt die Bedeutung eines organischen Nährmaterials zu. Sie deckt sich mit der Wirkung des Traubenzuckers.

Es ist natürlich nicht angängig, von den beim Kaltblüter gewonnenen Resultaten sichere Schlüsse auf die Verhältnisse beim Warmblüter abzuleiten. Es ist also noch nicht bewiesen, daß auch beim Menschen der Viscosität des Blutes für das Herz und besonders das Gefäßsystem keine große Bedeutung zukommt; doch glaube ich, daß meine Untersuchungsergebnisse wenigstens eine brauchbare Grundlage für eine kritische Behandlung dieser Frage bilden können. Nur von diesem Gesichtspunkt aus will ich noch etwas näher auf die anfangs erwähnten Arbeiten von Kestner und Bayliss eingehen. Kestner vergleicht die Wirkung von physiologischer Kochsalzlösung mit einer 2—3 proz. Gummi enthaltenden, dem Serum isoviskösen Kochsalzlösung. Die gewöhnliche Kochsalzlösung auch Ringerlösung hat bei Durchspülung von der Aorta eines Hundes aus zu Ödemen der inneren Organe geführt, die isovisköse NaCl-Lösung dagegen nicht. Daß die physiologische Kochsalzlösung eine schädliche Wirkung gehabt hat, ist ohne weiteres verständlich; denn in ihr sind die für das Leben und die normale Funktion fast aller tierischen Zellen unbedingt notwendigen Kationen Kalium und Calcium nicht enthalten. Fehlen sie in der die Zelle umspülenden Flüssigkeit, so ist die Funktion fast immer gestört, bzw. ganz aufgehoben. Besonders gilt dies auch für das Herz und das Gefäßsystem. Kalium- und Calciummangel führen zur Erschlaffung des Herzmuskels und machen eine systolische Kontraktion unmöglich. Kalküberfluß dagegen fördert die Kontraktionsfähigkeit. Noch spielt die physiologische Kochsalzlösung in der Klinik als Ersatzflüssigkeit bei Blutverlusten eine große Rolle. Es ist aber an der Zeit, dem Gebrauch der Kochsalzlösung für diese Zwecke ein Ende zu bereiten. Unzweifelhaft erfährt der Kreislauf eines ausgebluteten Menschen durch größere Mengen von Kochsalzlösung nicht nur keine Besserung, sondern trotz der vorübergehenden Zunahme des Blutvolumens eine nicht unerhebliche Schädigung. Dies waren auch die Gesichtspunkte, die Straub[1]) veranlaßt haben, für den praktischen Gebrauch

[1]) Straub, Münch. med. Wochenschr. 1920.

ein in Wasser lösliches Pulver (Normosal) herzustellen, das die notwendigen Salze entsprechend denen der Ringerlösung enthält. Daß Kestner mit der isoviskösen Kochsalzlösung auch bessere Resultate als mit Ringer erzielt hat, liegt wohl daran, daß der Calciumgehalt der Gummilösung noch erheblich größer ist als der der Ringer (Ringer 0,1 $CaCl_2$: 1000), Kestners Lösung nach meiner Berechnung etwa 0,5 $CaCl_2$: 1000.

Bayliss rühmt die Erfolge, die während des Krieges mit 0,9 proz. Kochsalzlösung erzielt wurden, der 6% Gelatine oder 7% Gummi zugesetzt war. Im Tierexperiment konnte er mit den kolloidalen Lösungen bedeutend größere Blutverluste ersetzen, als mit isotonischen und hypertonischen Kochsalzlösungen. Die günstigen Resultate Bayliss' bezweifle ich keineswegs; doch glaube ich, daß die theoretischen Grundlagen falsch sind. B. geht von folgenden Erwägungen aus: Das Blutserum hat einen bestimmten Kolloiddruck, den Starling zu 35 mm Hg bestimmte. In den Arteriolen und dem ersten sich anschließenden Capillarabschnitt ist unter normalen Verhältnissen der Blutdruck höher als der osmotische Druck der Blutkolloide; hier wird also eine Filtration in die umliegenden Gewebe erfolgen können. Wandern wir weiter nach unten in das Capillargebiet, so wird der Blutdruck gleich dem osmotischen Druck der Blutkolloide; hier kann also keine Filtration mehr stattfinden. Nach Blutverlusten wird nun bei Anwendung isotonischer Lösungen durch die Wasserinfusion der Kolloiddruck erniedrigt; dementsprechend erhöht sich der Filtrationsdruck, und die Zone, in der eine Wasserabgabe an die Gewebe erfolgen konnte, verbreitert sich. Auch bei hypertonischen Lösungen ist der Erfolg der gleiche. Bayliss setzt nun der Infusionsflüssigkeit ein Kolloid zu, damit der Druck dem osmotischen Drucke der Blutkolloide gleichkommt.

Es ist auffallend, daß Bayliss die guten Erfolge gerade durch Zusatz von Gelatine bzw. Gummi arabicum erzielt hat; sind doch — wie aus den bisherigen Erörterungen hervorgeht — die Gelatine und der Gummi diejenigen Kolloide, denen lediglich durch ihren hohen Gehalt an Calcium eine besondere Bedeutung zukam. Nach den anfangs wiedergegebenen Analysen entspricht der Calciumgehalt einer 6 proz. Gelatinelösung dem einer Ringerlösung, dessen Gehalt an $CaCl_2$ von 0,1 : 1000 auf 1,04 : 1000 erhöht ist. Die 7 proz. Gummi-arabicum-Lösung ist

noch kalkreicher, und zwar beträgt der $CaCl_2$-Gehalt 1,54:1000. Berücksichtigt man diesen außerordentlich hohen Kalkgehalt, so kann man Bayliss keineswegs beistimmen, wenn er annimmt, daß der Gummisalzlösung keine pharmakologisch-spezifische Wirkung zukommt. Beträgt die Menge der Infusionsflüssigkeit bei einem Menschen 1 Liter, so wäre die zugeführte Calciummenge beim Gummi = 1,54 g wasserfreies $CaCl_2$ oder etwa 3 g kristallinisches $CaCl_2$, bei der Gelatine 1 g wasserfreies, bzw. 2 g kristallinisches $CaCl_2$. Das sind Calciummengen, die auf Herz- und Gefäßsystem eine ungemein starke Wirkung ausüben müssen. Wir wissen, daß es gerade die Calciumionen sind, die den Tonus des Herzens und der Gefäße steigern, die die Zellkolloide der Gefäßwände festigen und so die Durchlässigkeit herabsetzen. Im Zusammenhang damit steht natürlich auch eine erhebliche Blutdrucksteigerung. Ob der Kolloiddruck, der Bayliss zum Zusatz der Kolloide veranlaßte, auch noch eine Rolle spielt, läßt sich natürlich nicht mit Sicherheit entscheiden; doch scheint mir dies mit Rücksicht auf die Froschversuche zum mindesten noch zweifelhaft.

Bayliss empfiehlt die Gummilösung nicht nur bei Blutverlusten, sondern z. B. bei der traumatischen Toxämie. Obwohl dies Krankheitsbild auf ganz andern Ursachen beruht, unterscheidet es sich — wie Bayliss angibt — äußerlich nur wenig von dem Schock nach starkem Blutverlust. Die nähere Erklärung geben Versuche von Bayliss und Cannon. Sie drückten die Schenkelmuskulatur einer narkotisierten Katze kräftig; dabei bildeten sich an den geschädigten Stellen toxische Produkte, welche für den Wundshok und die starke Blutdrucksenkung verantwortlich zu machen waren. Der Blutverlust war während der Operation so gering, daß er für die Erklärung des Shoks nicht in Frage kam. Auch bei diesem Krankheitsbild soll die intravenöse Injektion von Gummilösung eine günstige Wirkung herbeigeführt haben. Die bei der Gewebsläsion entstehenden toxischen Produkte rechnet Bayliss zu den Histaminen, die die Gefäße schädigen und so den Plasmakolloiden die Wege in das die Gefäße umgebende Gewebe öffnen; daraus folgt eine Abnahme der Blutmenge, die eine Senkung des Blutdrucks bewirkt. Die Gummilösung würde demnach als Ersatz für die ausgetretenen Plasmakolloide dienen. Die günstigen Erfolge, die

Bayliss mit der Gummilösung beim Wundshok erzielt hat, sollen nicht bezweifelt werden. Doch ist meine Auffassung über die Art der Wirkung eine ganz andere. Ich gehe ebenso wie Bayliss davon aus, daß die bei der Gewebsläsion entstehenden Eiweißabbauprodukte, wie z. B. das Histamin, für die Shokwirkung verantwortlich gemacht werden können. Das Histamin führt nämlich — wie auch Handovsky und Pick[1]) nachgewiesen haben —, zu einer Lähmung und Erschlaffung der Gefäße. Die Folge davon ist natürlich Blutdrucksenkung und erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße. Nun ist aber das im Gummi enthaltene Calcium gewissermaßen als Antidot für das Histamin aufzufassen, indem es die durch Histamin gelähmten und maximal erweiterten Gefäße wieder zur Kontraktion bringt. Das habe ich an Durchspülungsversuchen am Läwen-Trendelenburgschen Froschpräparat nachweisen können.

Infolge Zerstörung von Gehirn und Rückenmark sind die Froschgefäße an sich schon stark erweitert; will man die Wirkung von vasodilatierenden Stoffen prüfen, so ist es zweckmäßig, zunächst erst vasoconstrictorische Stoffe wie Serum oder Adrenalin zu injizieren; die Wirkung der gefäßlähmenden Substanzen läßt sich dann bedeutend besser erkennen. Auch bei meinen Versuchen bin ich in entsprechender Weise vorgegangen. Die folgende Tabelle enthält die genaueren Angaben (s. S. 260).

Wie aus der Tabelle ersichtlich, nimmt nach Histamin die Tropfenzahl stark zu, d. h. die zuvor kontrahierten Gefäße erschlaffen. Nach Zusatz von Calcium tritt aber von neuem eine Kontraktion der Gefäße ein. Die Tropfenzahl nimmt ab. Es sei noch bemerkt, daß die Calciumdosis, die eine Gefäßkontraktion herbeiführt, bei den histaminvergifteten Fröschen bedeutend größer als bei normalen ist. Bei letzteren liegt die untere Wirkungsquelle schon etwa bei 0,02 g wasserfreiem $CaCl_2$. Allerdings ist auch die gewählte Histamindosis eine ziemlich große. In der von Bayliss angewandten 7 proz. Gummi-arabicum-Lösung ist der Calciumgehalt jedoch so groß, daß die Calciumwirkung unbedingt zum Ausdruck kommen muß.

Aus den bisherigen Erörterungen geht zweifellos hervor, daß die Wirkung des Gummis im wesentlichen auf die Aschen-

---

[1]) Handovsky und Pick, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 71, 89. 1913.

Tabelle II.

Zeit	Durchströmungsflüssigkeit	Tropfenzahl in der Minute
11h 35′	Ringer	90
11h 37′	Injektion von 1 ccm Suprarenin-Höchst 1 : 500000 in den zuführenden Gummischlauch	
11h 39′		20
11h 40′		9
11h 40′	Injektion von 0,000 125 g Histamin	
11h 43′		36
11h 53′		36
11h 53′	0,000125 Histamin	
11h 55′		54
11h 55′	Injektion von 1 ccm = 0,04 wasserfreies $CaCl_2$	
11h 57′		46
11h 59′		36
12h 45′		28
12h 47′	0,00015 Histamin	
12h 49′		54
12h 50′	0,1 $CaCl_2$	
12h 51′		40
12h 54′		18

bestandteile, besonders den Kalkgehalt des Gummis zurückzuführen ist[1]). Die Tatsache, daß beim Kaltblüter der kolloidale Charakter der Ernährungsflüssigkeit für die Herzfunktion bedeutungslos ist, berechtigt aber ohne weiteres noch nicht dazu, dasselbe auch vom Gefäßsystem des Warmblüters zu behaupten. Daher ist es nicht ganz ausgeschlossen, daß bei der Gummiwirkung neben dem Calcium das eigentliche Kolloid auch noch eine Rolle spielt. Vielleicht hat die Gummilösung noch den Vorzug, daß sie als Schutzkolloid die Zufuhr relativ großer Calciummengen (in 1 Liter = 3 g kryst. $CaCl_2$) gestattet. Dazu kommt noch, daß im Organismus die Dissoziation des an eine organische Säure wie die Arabinsäure gebundenen Calciums wahrscheinlich nicht so schnell vor sich geht, wie die einer kalkreichen Ringerlösung. Die Wirkung wird dann wohl länger anhalten.

Nun ist aber zu bedenken, daß Herstellung, Aufbewahrung und vor allem Sterilisation kolloidaler Lösungen etwas um-

[1]) Seit Niederschrift dieser Arbeit sind eine Reihe neuer Abhandlungen erschienen, in denen über die günstige Wirkung des Gummi arabic. bei den verschiedenartigsten Störungen berichtet wird. Es handelt sich auch hier wahrscheinlich in erster Linie nur um Kalkwirkungen.

ständlich und unsicher ist. Kolloide stellen kein stabiles System dar, und man muß daher mit physikalischen Zustandsänderungen wie Trübungen oder Ausflockungen rechnen. Besonders gilt dies ja für die Gelatine. Ich glaube daher, daß man die Baylissche Gummilösung gut durch eine kalkreiche Ringerlösung wird ersetzen können. Der Calciumgehalt wäre von 0.1 auf etwa 0,8 g wasserfreien Calciumchlorids zu 1000 Aq. dest. zu erhöhen; doch richtet sich dies nach der Menge der Infusionsflüssigkeit. Ich glaube nicht, daß die Wirkung wesentlich von der der Gummiarabicum-Lösung abweichen würde.

Zusammenfassung.

Der kolloidale Charakter der Nährflüssigkeit hat für die Funktion des Froschherzens keine Bedeutung.

Zwar können Kolloide wie Gelatine und vor allem Gummiarabicum den Tonus des normalen Herzens steigern, die Funktion des erschöpften Herzens wiederherstellen und auch bestimmte Giftwirkungen aufheben. Die Wirkung wird aber nicht durch das Kolloid selbst, sondern durch seinen Gehalt an anorganischen Beimengungen, vor allem Calcium erzielt. Pharmakologisch indifferente Kolloide, die in der angewandten Konzentration keine oder nur wenig anorganische Salze enthalten (z. B. Traganth), sind wirkungslos. Lösliche Stärke wirkt als organisches Nährmaterial wie Traubenzucker. Serum nimmt eine besondere Stellung ein.

Die 7proz. Gummi-Kochsalzlösung, die Bayliss als Ersatzflüssigkeit bei Blutverlusten und zur Behandlung der mit Blutdrucksenkung einhergehenden traumatischen Toxämie verwendet, kann wahrscheinlich durch eine Ringerlösung ersetzt werden, deren Kalkgehalt erhöht ist.

Sind die Chlorionen der Ringerlösung im schlagenden Froschherzen durch andere Anionen ersetzbar?

Von

E. R. O. Finckh.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. Januar 1921.)

Im Jahre 1902 teilte der holländische Pharmakologe Stokvis (Ned. Tijdschr. v. Geneesk. *1.* 1428, 1902) Versuche mit, aus denen hervorzugehen schien, daß bei der Ernährung des arbeitenden Froschherzens das Chlor des Kochsalzes der Nährlösung durch Brom oder Jod ersetzt werden könne. Da Stokvis den Herzapparat Kroneckers benutzte und das Froschherz mit einer Mischung von einem Teil Rinderblut und drei Teilen Salzlösung ernährte, so erscheinen uns heute seine Versuchsergebnisse als nicht vollständig beweisend. Daher habe ich es auf Anregung des Herrn Geheimrat Prof. Dr. Heffter unternommen, die Frage des Chlorersatzes durch andere Anionen mit der einfachen und bewährten Methode von W. Straub nachzuprüfen. Beim Ersatz des Kochsalzgehaltes der Ringerlösung durch andere Natriumsalze wurden natürlich die äquimolekularen Mengen der betreffenden Salze verwendet.

A. Ersatz des Kochsalzes durch Natriumbromid (auf 1000 ccm Ringerlösung 10,7 g Natriumbromid).

Es wurden zwei Versuche angestellt, bei denen die Herzen $5^1/_2$ und $7^1/_2$ Stunde am Kymographion arbeiteten. Ich kann auf eine Ausführung der Versuchsprotokolle verzichten, da sie ungefähr die gleichen Veränderungen der Pulskurve zeigten, wie sie bei reiner Ringerlösung auftreten. Man darf aus diesen beiden Versuchen schließen, daß die Chlorionen des Kochsalzes der Ringerlösung sehr wohl durch Bromionen ersetzt werden können, ohne das Herz zu schädigen.

Um nachzuprüfen, ob es nicht möglich sei, sämtliches Chlor der Ringerlösung durch Brom zu ersetzen, indem man statt des Calciumchlorids und Kaliumchlorids die entsprechenden Bromverbindungen verwandte, wurde folgende Lösung am Froschherzen untersucht: NaBr 10,7, $CaBr_2$ 0,18, KBr 0,12, $NaHCO_3$ 0,1, Aqu. dest. ad 1000,0. Von den beiden angestellten Versuchen teile ich folgenden ausführlich mit:

Versuch 16. XI. 1920. R. temp. 65 g.

Beginn: 11^h. Herz arbeitet mit RiLösung etwas langsam. Hubhöhen außerordentlich hoch, Herzarbeit sehr kräftig.

11^h 9′. Ersatz der RiLösung durch BrLösung. Hubhöhen sinken etwas, Frequenz wird noch ein wenig langsamer.

11^h 15′. Frische BrLösung. Hubhöhen steigen plötzlich nach dem Wechsel, kehren aber sofort wieder zur alten Höhe zurück. Frequenz wird wieder rascher.

11^h 42′. Frische BrLösung. Keine Änderung, Frequenz wird allmählich schneller.

12^h. Frische BrLösung. Keine Änderung.

12^h 5′. Frische BrLösung. Hubhöhen steigen etwas an.

12^h 30′. Hubhöhen haben die Höhe des Versuchsbeginnes erreicht.

12^h 35′. Frische BrLösung. Keine Veränderung außer ganz geringfügigen positiven und negativen Schwankungen der Hubhöhen. Hubhöhen behaupten bis 1^h dieselbe Frequenz unverändert.

1^h. Versuch abgebrochen.

Es geht hieraus deutlich hervor, daß es sehr wohl möglich ist, sämtliche Chlorionen der Ringerlösung ohne wesentliche Beeinträchtigung der Herztätigkeit durch Brom zu ersetzen. Wir können also die Befunde von Stokvis für den Ersatz des Chlors durch Brom noch erweitern und daraus den Schluß ziehen, daß für die Herztätigkeit die Chlor-Ionen keine wesentliche Rolle zu spielen scheinen.

B. Ersatz des Kochsalzes durch Natriumjodid.

Zwei Versuche, in denen das Kochsalz der Ringerlösung durch eine äquimolekulare Jodnatriummenge ersetzt worden waren, zeigten, daß die Jodionen eine deutliche Wirkung auf das Herz entfalten. Herzarbeit und Herzkraft lassen schnell nach, und es treten oft Gruppenbildungen auf. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Stokvis konnte ich feststellen, daß schon während der ersten beiden Stunden die Herztätigkeit

sowohl in chronotroper wie inotroper Richtung stark negativ beeinflußt wird.

In einigen Versuchen habe ich festzustellen unternommen, bei welchem Gehalt der Lösung an Jodnatrium die schädigende Wirkung beginnt. Es wurde also in der Ringerlösung das Kochsalz in verschiedenen Abstufungen durch Jodnatrium ersetzt. Als Ergebnis dieser Versuche ist festzustellen, daß eine Ringerlösung, in der nur ein Sechstel des Kochsalzgehaltes durch Jodnatrium ersetzt war, noch deutlich das Herz schädigte, wenn auch natürlich die Giftwirkung langsamer und schwächer eintrat als bei dem höheren Jodgehalt.

Um eine Vorstellung von der Art der schädigenden Wirkung des Jodes zu erhalten und festzustellen, ob etwa eine Bindung abgespaltenen Jodes in den Geweben eintrete, habe ich an geschädigten Herzen Ausspülungen mit reiner Ringerlösung vorgenommen. In der Tat gelang es, durch mehrmaliges Auswaschen mit Ringerlösung die Herztätigkeit so weit zu heben, daß die Hubhöhen sich wieder beträchtlich verbesserten. Um festzustellen, ob die schädigende Wirkung auf elementares Jod zurückzuführen sei, versuchte ich, dieses Jod durch Natriumthiosulfat zu binden. Nachdem festgestellt worden war, daß eine Ringerlösung mit 1‰ Natriumthiosulfat das Herz in keiner Weise schädlich beeinflußte, wurde in zwei Versuchen folgende Lösung angewendet: NaJ 14,5, $Na_2S_2O_3$ 1,0, KCl 0,075, $CaCl_2$ 0,1, $NaHCO_3$ 0,1, Aqu. dest. ad 1000,0. Wenn auch die schädigende Wirkung, die in früheren Versuchen mit Jodnatrium sich zeigte, nicht verschwunden war, so ergab sich doch, daß die Herzen unter dem Einfluß des Thiosulfates wesentlich besser und regelmäßiger arbeiteten als mit Jodnatrium allein, so daß die Giftwirkung zwar nicht aufgehoben, aber doch vermindert wird.

C. Ersatz des Kochsalzes durch Natriumnitrat.

Werden die Chlorionen der Ringerlösung durch NO_3-Ionen ersetzt, so sinken die Hubhöhen langsam und stetig, wie sich aus zwei Versuchen ergab. Bei der Überlegung, auf welche Art und Weise diese Giftwirkung zustandekommt, drängte sich die Vermutung auf, daß möglicherweise die NO_3-Ionen durch reduzierende Wirkungen der Muskelzellen in NO_2-Ionen verwandelt würden. Nachdem zunächst festgestellt war, daß nach zwei-

stündiger Herzarbeit mit salpeterhaltiger Ringerlösung das Lungesche Reagenz in der Versuchslösung eine stark positive Reaktion ergab, wurde in einem weiteren Versuch in Abständen von 10 bis 20 Minuten die Nährlösung des arbeitenden Herzens auf Nitrit untersucht. Hierbei ergab sich, daß bereits eine halbe Stunde nach Beginn des Versuches Nitrit gebildet war.

Zusammenfassung.

1. Das isolierte, nach Straub arbeitende Froschherz kann längere Zeit mit einer Nährlösung arbeiten, in der sämtliches Chlor durch Brom ersetzt ist.

2. Der Ersatz des Chlores durch Jod ist ohne Schädigung des Herzens nicht ausführbar. Der entgegenstehende Befund von Stokvis ist dadurch zu erklären, daß er eine Rinderblutmischung verwendete. Die schädigende Wirkung der Jodionen ist wahrscheinlich auf die Bildung von elementarem Jod zurückzuführen.

3. Der Ersatz des Kochsalzes in der Ringerlösung durch Natriumnitrat führt zu einer Schädigung der Herztätigkeit, die wahrscheinlich durch das Entstehen von Nitrit bedingt ist.

Die Verteilung des Harnstoffes im Organismus.

Von

K. L. Gad Andresen.

(Aus dem Zoophysiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 1. Februar 1921.)

Nachdem Prevost und Dumas[1]) im Jahre 1823 den Harnstoff im Blute nachwiesen, haben zahlreiche Forscher sich mit der Frage nach der Bildung und dem Schicksal des Harnstoffes im Blute beschäftigt.

Obwohl die Bildung des Harnstoffs zum Teil noch eine offene Frage ist, ist man sich jedenfalls darüber klar, daß es größtenteils in der Leber gebildet, vom Blute fortgeführt und durch die Nieren ausgeschieden wird. Da der Harnstoff ja sowohl im Wasser als in den Lipoiden leicht löslich ist, ist es naheliegend, daß eine Diffusionsverteilung im ganzen Körper vor sich geht. Andererseits kann man nicht mit Bestimmtheit sagen, ob dieses sich so verhält, da die verschiedenen Organe des Organismus sich bekanntlich Stoffen gegenüber, die sie aus irgend einem Grunde am Eindringen verhindern wollen, elektiv verhalten können; wäre dieses der Fall, würde man natürlich weniger Harnstoff in dem betreffenden Organ als im Blute finden.

Andrerseits wäre ja auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß außer den Nieren Organe vorhanden wären, die aktiv Harnstoff ausscheiden oder aufhäufen, und in diesem Falle würde man also in diesen eine höhere Harnstoffkonzentration als im Blute finden.

Seitdem man sich mit der Ausarbeitung von Methoden zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs beschäftigt hat, sind auch vergleichende Bestimmungen über Harnstoffkonzentrationen im Blute und in den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus angestellt worden.

Die hierbei erhaltenen Ergebnisse weichen stark voneinander ab.

Die Ursache dieser Abweichungen ist sicher in erster Linie darin zu suchen, daß die zur Verfügung stehenden Methoden keine spezifischen Harnstoffmethoden waren, da nämlich eine Reihe anderer stickstoffhaltiger Stoffe die Ergebnisse beeinflußt haben. Der erste, der eine Methode ausgearbeitet hat, die den Versuch einer Isolierung des Harnstoffes bezweckt, ist Schöndorff[2]), der die Methode zum Vergleich der Harnstoffkonzentration im Blute und in einzelnen Organen angewendet hat. Er kommt hierbei zu dem Ergebnis, daß die Konzentration annähernd gleich sei.

Nach jener Zeit wurde eine Reihe Arbeiten über dasselbe Thema geschrieben, die jedoch in den meisten Fällen als ein Rückschritt anzusehen sind, da keine spezifischen Harnstoffmethoden angewendet wurden. Die erste Arbeit über die Harnstoffkonzentration im Blute und in den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus, bei der eine spezifische Harnstoffmethode verwendet wurde, ist von Marshall und Davis[3]) veröffentlicht worden, bei welcher der letztere die von Marshall ausgearbeitete Ureasemethode benutzt hat. Bekanntlich verwandelt Urease den Harnstoff — und nur den Harnstoff — in Ammoniak, während die übrigen stickstoffhaltigen Stoffe, die im Organismus vorhanden sind, durch Urease nicht beeinflußt werden. Marshall und Davis waren also in der Lage, die tatsächlichen Harnstoffkonzentrationen innerhalb der Fehlergrenze, welche die Methode gibt, zu bestimmen, doch ist bei der Arbeit ein sehr wesentlicher Fehler begangen worden, so daß man nicht wissen kann, ob die erhaltenen Ergebnisse die tatsächlichen Harnstoffkonzentrationen darstellen, da nämlich keine gesonderten Bestimmungen an Ammoniak gemacht wurden. Die gefundenen Zahlen sind deshalb kein Ausdruck für die Harnstoffkonzentration, sondern für die Harnstoff- plus Ammoniakkonzentration.

Während man so Versuche zur Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Blute und in den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus angestellt hat, ist die Frage, ob zwischen dem Harnstoff im Blute und den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus Gleichgewicht besteht, einer Untersuchung noch nicht unterworfen worden.

Um dieses entscheiden zu können, ist es erforderlich, den Verteilungskoeffizienten zwischen dem Plasma und den verschiedenen Organen und Sekreten zu kennen, wobei ich unter dem Verteilungskoeffizienten das Verhältnis der Harnstoffkonzentrationen bei bestehendem Gleichgewicht verstehe. In dieser Arbeit habe ich den Verteilungskoeffizienten bestimmt und darauf die Frage zu lösen versucht, ob zwischen Harnstoff im Blute und in den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus Gleichgewicht besteht oder nicht.

Methode.

Bei den in dieser Arbeit an Blut und Sekreten gemachten Bestimmungen habe ich eine von mir[4]) ausgearbeitete Bromnatronmethode verwendet. Bei den Bestimmungen an Geweben habe ich die Ureasemethode in einer durch van Slyke und S. Cullen modifizierten Form angewendet.

Die Bromnatronmethode ist in der von mir ausgearbeiteten Form eine spezifische Harnstoffmethode, indem wegen der übrigen stickstoffhaltigen Stoffe, die vom Bromnatron zersetzt werden, eine Berichtigung durch Abzug einer Korrektion von 0,5 mg pro 100 ccm vom Analyseresultat vorgenommen wird.

Daß dieses richtig ist, wurde durch einen Vergleich dieser Methode mit der Ureasemethode kontrolliert, die ja als eine spezifische Harnstoffmethode anzusehen ist und mit welcher sie übereinstimmende Resultate gibt. Daß ich die von mir ausgearbeitete Methode und nicht die Ureasemethode verwendet habe, beruht teils darauf, daß diese Methode genauere Ergebnisse als die Ureasemethode ermöglicht, teils darauf, daß die Ureasemethode größere Stoffmengen, in der Regel 3—5 ccm erfordert, während zu meiner Methode nur 0,10—0,15 ccm erforderlich sind, was bei vielen meiner Versuche von außerordentlich großer Bedeutung ist.

Bei der Ureasemethode variieren die Doppelbestimmungen mit 1 bis 2 mg pro 100 ccm, wogegen der größte Fehler, mit dem man bei meiner Methode rechnen muß, sich nur auf 0,5 mg pro 100 ccm beläuft.

Das Prinzip der von mir ausgearbeiteten Methode beruht auf einer Fällung der Proteinstoffe des Blutes durch Kochen mit 0,01 n-Essigsäure, der als Puffer Natriumacetat laut dem Sørensenschen Verfahren zugesetzt worden ist. Der koagulierte Proteinstoff wird abfiltriert, und im Filtrat wird dann der Harnstoff durch Zersetzung mit Bromnatron von konstanter Zusammensetzung bestimmt.

Die entwickelte Stickstoffmenge wird in Kroghs Mikrorespirometer gemessen. Die benutzten Kolben sind etwa 10—15 ccm groß und mit Glasstopfen, welcher einen angeblasenen Behälter zur Aufnahme des Bromnatrons trägt, versehen.

Mittels der von Krogh angegebenen Formel wird dann berechnet, welche Stickstoffmenge in Kubikmillimetern der in Millimetern abgelesenen Drucksteigerung entspricht. Durch Multiplikation der Kubikmillimeterzahl mit $1{,}256 \cdot 10^{-3}$ sowie mit einer Korrektion erhält man die Stickstoffmenge in Milligramm gemessen.

Die obengenannte Korrektion wird eingeführt, weil der Prozeß zwischen dem Harnstoff und dem Bromnatron — wie es M. Krogh[6]) nachgewiesen hat — nicht vollständig nach der Gleichung:

$$CO(NH_2)_2 + 3\,NaOBr + 2\,NaOH = Na_2CO_3 + 3\,NaBr + 3\,H_2O + N_2$$

verläuft. Der Prozeß ist von dem Verhältnis zwischen Brom und Natronlauge abhängig, so daß man die mittels Bromnatron erhaltenen Stickstoffzahlen nicht direkt benutzen kann; arbeitet man aber mit einem Bromnatron von konstanter Zusammensetzung, braucht man die Bromnatronzahl mittels Kjeldahlbestimmungen nur ein einziges Mal zu kontrollieren.

Aus dem Verhältnis der beiden Zahlen ergibt sich die Korrektion, mit der man die Bromzahl multiplizieren muß, um die wahre Stickstoffzahl zu erhalten.

Bei den Bestimmungen wurde ein Bromnatron folgender Zusammensetzung benutzt: 1 ccm Brom zu 100 ccm 2n-Natron. Für dieses ist die Korrektion 1,08.

Die Harnstoffbestimmung im Blute selbst wird in der Weise ausgeführt, daß man mittels einer kalibrierten Mikropipette 0,10 oder 0,15 ccm Blut abmißt. Im voraus mißt man in einem Zwergreagensglas 1 ccm 0,01 n-Essigsäure ab, die aufgelöstes Natriumacetat enthält, so daß die Flüssigkeit hinsichtlich des Natriumacetates 0,002 n ist. Das Blut wird in das Reagensglas hinübergebracht, worauf die Proteinstoffe durch Kochen der Blutlösung zum Koagulieren gebracht werden. Der Niederschlag wird abfiltriert und im Filtrat wird dann der Harnstoff durch Zersetzung mit Bromnatron bestimmt, wie ich früher beschrieben habe (siehe diese Zeitschr. **99**). Wenn man zur Bestimmung 0,10 ccm Blut verwendet hat, erhält man die Harnstoffstickstoffmenge pro 100 ccm durch Multiplikation der entwickelten Anzahl Kubikmillimeter Luft mit der Größe $\frac{1,256 \cdot 1,08 \cdot 10^2}{0,10 \cdot 10^6}$.

Wenn man es wünscht, kann man dann berechnen, einer welchen Harnstoffmenge der entwickelte Stickstoff entspricht.

Bei den Bestimmungen in dieser Abhandlung wurde keine Umrechnung in Harnstoff vorgenommen, sondern es wurden nur die Werte für Harnstoffstickstoff pro 100 ccm oder bei Gewebebestimmungen pro 100 g angegeben.

In den Sekreten und Geweben, in denen ich den Harnstoff bestimmt habe, war es noch dazu notwendig, gleichzeitig das Ammoniak zu bestimmen, da die für Ammoniak in Sekreten und Geweben angegebenen Werte im Gegensatz zum Blute, wo die Ammoniakmenge sehr gering und beinahe konstant gefunden war, stark variieren, so daß ich mich nicht a priori damit begnügen konnte, für Gewebe und Sekrete dieselbe Korrektion wie für Blut einzuführen und dann davon auszugehen, daß der Rest Harnstoff sei. Der Ammoniak wurde bei Sekreten nach der von mir[6a]) ausgearbeiteten Methode und bei Geweben in der Weise bestimmt, wie Cullen und van Slyke es in ihrer Abhandlung über Harnstoffbestimmungen mit der Ureasemethode beschrieben haben.

Der Verteilungskoeffizient des Harnstoffs zwischen Plasma und Blutkörperchen.

Die erste Arbeit über den Verteilungskoeffizienten des Harnstoffs auf Plasma und Blutkörperchen, die in dieser Verbindung von Bedeutung ist, wurde von Schöndorff[7]) ausgeführt.

Er findet erstens, daß die Blutkörperchen im Gegensatz zu früheren Anschauungen Harnstoff enthalten, und daß der Harnstoff gleichförmig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt ist. Gleichzeitig findet er, daß der Harnstoff sich gleichförmig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt, wenn man dem Blute eine isotonische Harnstofflösung zusetzt; und ver-

dünnt man das Blut mit einer isotonischen Kochsalzlösung, tritt der Harnstoff aus den Blutkörperchen aus, bis er wieder gleichförmig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt ist. Verfolgt man die Analysenergebnisse Schöndorffs, indem man den Mittelwert für Harnstoff aller seiner Analysen nimmt, findet man aber, daß Plasma mehr Harnstoff als die Blutkörperchen enthält. Die Angabe Schöndorffs, daß der Harnstoff sich gleichförmig verteile, beruht auf ungenügender Schärfe seiner Methode, so daß er sich nicht auf die einzelnen Analysenresultate verlassen konnte, da die erhaltenen Unterschiede so klein sind, daß sie innerhalb der zufälligen Fehlergrenze liegen, mit der seine Methode behaftet ist. Bei richtiger Behandlung seines Zahlenmaterials hätte Schöndorff indessen gefunden, daß ca. 10% mehr Harnstoff im Plasma als in den Blutkörperchen enthalten ist. Daß der Harnstoff sich gleichmäßig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt, wurde auch von J. Bang[8]) gefunden, der es a priori als notwendig ansah, daß es sich so verhalten muß, da die Lipoidmembran der Blutkörperchen dem Harnstoff gegenüber permeabel ist. Bang hat zu seinen Bestimmungen verschiedene Arten Tierblut mit normalem Harnstoffgehalt verwendet und diesen nach der von ihm selbst ausgearbeiteten Mikromethode bestimmt, die indessen zu diesem Zwecke nicht genau genug ist, da man durchgehends mit einem Fehler von ca. 10% bei der Bestimmung selbst rechnen muß, welches bedeutet, daß er gar nicht imstande war, Größen der hier in Frage stehenden Ordnung zu bestimmen. Bang hat nach dem von ihm angewendeten Verfahren nichts anderes finden können, als daß der Harnstoff sich gleichmäßig auf Plasma und Blutkörperchen verteile. v. Scheel[9]), der nach der Vorschrift von Bang verfuhr, kommt zu dem gleichen Ergebnis. Aronssohn[10]), der den Harnstoff im Blute und im Serum bestimmt hat, findet dagegen, daß ein so großer Unterschied zwischen der Harnstoffkonzentration im Gesamtblute und im Serum besteht, daß es nicht angängig sein könne, eine Harnstoffbestimmung am Serum vorzunehmen, wenn man die Harnstoffkonzentration im Blute angeben solle, sondern daß man die Bestimmung am Blute selbst vornehmen müsse. Die Ergebnisse, zu welchen Aronssohn gelangt, sind unrichtig, doch ist die Beschreibung seines Verfahrens nicht ausführlich genug, um zeigen zu können, wo der Fehler liegt.

Wenn auch seine Methode nicht besonders fein ist, kann man doch andererseits die Ungenauigkeit seiner Ergebnisse nicht ausschließlich auf den Mangel an Feinheit seiner Methode zurückführen. Die Bestimmungen nimmt er in folgender Weise vor, indem er 10 ccm Blut oder Serum abmißt, die Proteinstoffe mittels Alkohol fällt und den Niederschlag abfiltriert, darauf das Filtrat auf einem Wasserbad bis zur Trockenheit eindampft, die Remanenz im Wasser auflöst und schließlich den Harnstoff durch Zersetzung mit Bromnatron bestimmt, worauf er die entwickelte Stickstoffmenge mittels Yvons Apparat mißt. Ganz dieselbe Methode benutzt Widal[11]), der ebenfalls findet, daß das Plasma mehr Harnstoff als das Totalblut enthält, doch sind die Unterschiede so klein, höchstens einige wenige Milligramm, daß Widal im Gegensatz zu Aronssohn für gleichgültig hält, ob man die Harnstoffkonzentration im Plasma oder im Totalblut bestimmt.

Eigene Untersuchungen.

Um den Verteilungskoeffizienten zwischen Plasma und Blutkörperchen zu finden, habe ich eine Reihe von Bestimmungen vorgenommen, teils direkt an Blut mit normalem Harnstoffgehalt und teils an Blut, dem ich zuvor variierende Harnstoffmengen zusetzte.

Den Harnstoff habe ich, wie schon erwähnt, nach meiner Methode bestimmt, bei der man mit einem Fehler von höchstens 0,5 mg pro 100 ccm, rechnen muß. Dieser Fehler spielt keine Rolle, wenn es sich um Blut mit hohem Harnstoffgehalt handelt, aber bei Blut mit normalem Harnstoffgehalt wird sogar dieser Fehler einen merkbaren Einfluß auf das Ergebnis ausüben, so daß man nicht mit Sicherheit mit den Werten rechnen kann, die man für den Verteilungskoeffizienten bei normalem Blute erhält.

Die Bestimmungen nahm ich in der Weise vor, daß ich die Harnstoffstickstoffkonzentration im Totalblut und im Plasma bestimmte und dann nach dem untenstehenden Schema berechnete, wieviel Harnstoffstickstoff Plasma und Blutkörperchen pro 100 ccm enthielten. Aus dem Verhältnis zwischen den beiden Zahlen erhält man dann den Verteilungskoeffizienten. Die Plasmamenge pro 100 ccm berechnete ich aus dem Längenverhältnis zwischen dem Hämatokritrohr und der Plasmasäule, nachdem ich das Blut zentrifugiert hatte.

Die meisten Bestimmungen nahm ich in der hier beschriebenen Weise vor, doch habe ich auch der Kontrolle halber einige Bestimmungen direkt an Blutkörperchen und Plasma vorgenommen.

Die ersterwähnte Methode habe ich aus dem Grunde angewendet, weil es schwierig ist, Blutkörperchen ohne Beimengung von Plasma aus einem Hämatokritrohr herauszubekommen, während es leicht ist, Plasma ohne Beimengung von Blutkörperchen herauszubekommen. Ich begann in der Weise zu verfahren, daß ich dem Blute direkt Harnstoff zusetzte, das Blut einige Male schüttelte und dann die Harnstoffstickstoffkonzentration durch eine Doppelbestimmung bestimmte.

Es zeigte sich dann, daß die Doppelbestimmungen nicht übereinstimmten, sondern bis zu mehreren Prozent voneinander abwichen. Ließ ich das Blut einige Stunden stehen, ergaben die Doppelbestimmungen übereinstimmende Résultate. Es stellte sich heraus, daß dieses teils darauf beruhte, daß der Harnstoff,

der großblätterig krystallinisch war, sich nicht so schnell im Blute auflöste, wie ich im voraus angenommen hatte, und teils darauf, daß das Blut sich nur schwer mischte. Ich setzte Ringers Flüssigkeit etwas Harnstoff zu und konnte dann deutlich beobachten, daß der Harnstoff lange „umhersegelte“, ohne sich aufzulösen, was ja bedeutet, daß der Auflösungsprozeß im Blute noch länger dauert. Um dessen sicher zu sein, daß der Harnstoff wirklich aufgelöst sei, verfuhr ich nun in der Weise, daß ich den Harnstoff in 1—2 ccm Ringers Flüssigkeit auflöste und dann diese zu 100 ccm Blut zusetzte. Nachdem ich das Blut einige Male geschüttelt hatte, goß ich es in eine Mischmaschine, in der es einige Minuten lang sehr intensiv gemischt wurde. Verfuhr ich in dieser Weise, herrschte immer zwischen den Doppelbestimmungen Übereinstimmung.

Das Zentrifugieren nahm ich mittels einer Zentrifuge vor, die ich zwecks Erreichung einer möglichst großen Schnelligkeit im Vakuum laufen ließ. Es dauerte etwa 8—10 Minuten, bis die Blutkörperchen ein konstantes Volumen annahmen, worauf ich berechnete, wieviel Volumenprozent Plasma im Blute vorhanden waren.

Bei den meisten Bestimmungen benutzte ich Ochsenblut, teils Oxalatblut, teils defibriniertes Blut nebst einer einzelnen Blutprobe, der ich Hirudin zugesetzt hatte.

Zugleich machte ich einzelne Bestimmungen an anderen Warmblütern, um festzustellen, ob ein Unterschied vorhanden sei, wobei es sich ergab, daß der Koeffizient für die verschiedenen Tiere gleich ist.

Eine einzelne Bestimmung machte ich am Froschblut, da die Möglichkeit einer anderen Verteilung als bei den Warmblütern ja nicht ausgeschlossen erschien. Doch auch hier fand ich denselben Verteilungskoeffizienten. In der untenstehenden Tabelle habe ich den Verteilungskoeffizienten bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen angegeben. Die Tabelle zeigt, daß der Harnstoff sich nicht gleichmäßig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt, sondern daß die Blutkörperchen weniger Harnstoff enthalten, und zwar 72—80% der im Plasma enthaltenen Menge, wenn man die Harnstoffmenge pro 100 ccm Plasma bzw. 100 ccm Blutkörperchen berechnet. Die Tabelle zeigt ferner, daß bei steigender Konzentration mehr Harnstoff in die Blutkörperchen

übergeht, und diese Steigerung beträgt für den untersuchten Konzentrationen etwa 8%.

Der Verteilungskoeffizient liegt also sowohl für Warmblüter als für Kaltblüter zwischen 0,70—0,80.

Tabelle I.

Der Verteilungskoeffizient für Harnstoff auf Plasma und Blutkörperchen.

Versuche an Ochsenblut.

Die 100 ccm Blut zugesetzte Harnstoffmenge g	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blut a mg	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Plasma b mg	Plasma pro 100 ccm Blut c ccm	Harnstoffstickstoff im Plasma b × c = d mg	Harnstoffstickstoff in den Blutkörperchen a − d = e mg	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blutkörperchen $\frac{e}{100-c} = f$ mg	Der Verteilungskoeffizient $\frac{f}{b}$	Der durchschnittliche Verteilungskoeffizient bei den verschiedenen Harnstoffkonzentrationen
0,0	13,4	14,5	70,6	10,2	3,2	10,9	0,76	0,76
0,10	54,5	60,8	63,0	38,3	16,2	43,9	0,72	
0,10	56,9	62,7	66,0	41,4	15,5	45,8	0,73	0,723
0,10	58,5	64,6	66,0	42,7	15,8	46,5	0,72	
0,25	122,0	133,2	66,0	87,9	34,1	100,0	0,75	0,75
0,30	147,5	171,0	66,9	104,4	43,1	130,2	0,76	
0,30	157,1	176,6	60,0	105,6	41,5	137,5	0.77	0,763
0,30	153,2	165,2	70,6	116,6	36,6	124,9	0,76	
0,50	248,6	266,2	68,0	181,0	67,6	211,2	0,79	
0,50	257,6	281,8	62,3	175,6	82,0	217,8	0,78	0,787
0,50	235,3	275,4	62,2	171,5	81,8	217,0	0,79	
0,60	292,8	314,0	66,0	207,2	85,6	251,9	0,80	0,80
0,60	297,4	322,8	65,0	209,8	87,6	250,3	0,80	

In der Tab. II sind die an anderen Tierarten gemachten Bestimmungen angeführt, die ich vornahm, um festzustellen, ob ein abweichender Verteilungskoeffizient bestände. Diese Bestimmungen nahm ich direkt an den Blutkörperchen und am Plasma vor, wodurch ich auch in der Lage war, meine anderen am Totalblut und Plasma gemachten Bestimmungen einer Kontrolle zu unterwerfen.

Tabelle II.

Die 100 ccm Blut zugesetzte Harnstoffmenge g	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Plasma mg	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blutkörperchen mg	Der Verteilungskoeffizient	
0,0	18,9	13,8	0,73	Ochsenblut
0,0	65,0	46,7	0,72	Froschblut
0,30	160,1	124,2	0,78	Katzenblut
0,60	299,2	240,0	0,80	Pferdeblut

Ferner machte ich einige Bestimmungen über den Verteilungskoeffizienten des Harnstoffes auf Ringers Flüssigkeit und die Blutkörperchen. Schöndorff kommt, wie schon erwähnt, zu dem Ergebnis, daß eine gleichmäßige Verteilung stattfindet.

Ich war ursprünglich geneigt anzunehmen, daß mehr Harnstoff in Ringers Flüssigkeit als in das entsprechende Plasma überginge, aber die Tabelle zeigt, daß der Verteilungskoeffizient ungefähr derselbe wie zwischen Plasma und Blutkörperchen ist.

Für die Bestimmungen maß ich gleiche Teile Blutkörperchen und Ringers Flüssigkeit ab, worin ich zuvor den Harnstoff aufgelöst hatte.

Tabelle III.

Der Verteilungskoeffizient für Harnstoff auf Ringers Flüssigkeit und Blutkörperchen.

Die 100 ccm Blutkörperchenaufschlämmung zugesetzte Harnstoffmenge g	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blutaufschlämmung mg	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Ringers Flüssigkeit mg	Ringers Flüssigkeit pro 100 ccm Blutaufschlämmung ccm	Harnstoffstickstoff in Ringers Flüssigkeit mg	Harnstoffstickstoff in den Blutkörperchen mg	Harnstoffstickstoff in 100 ccm Blutkörperchen mg	Der Verteilungskoeffizient
0,10	48,5	54,1	60	32,5	16,0	40,0	74
0,30	142,1	158,3	60	94,9	47,2	118,0	74
0,50	236,2	262,3	60	157,4	78,7	195,0	75
0,60	282,1	313,8	60	188,3	93,8	234,5	76

Wenn der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und Blutkörperchen und zwischen Ringers Flüssigkeit und Blutkörperchen derselbe ist, so muß der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und Ringers Flüssigkeit 1 sein. Hiervon ausgehend darf man sicher den Schluß ziehen, daß der Verteilungskoeffizient ebenfalls zwischen Plasma und den verschiedenen Sekreten des Organismus 1 ist, während dieses nicht ohne weiteres für Plasma und Gewebe anzunehmen ist.

Während die Anzahl derjenigen, die sich mit der Frage nach dem Verteilungskoeffizienten beschäftigt haben, verhältnismäßig gering ist, liegt eine ansehnliche Reihe von Arbeiten über die Harnstoffkonzentration im Blute im Vergleiche mit der Harnstoffkonzentration der verschiedenen Organe und Sekrete des Organismus vor. Die meisten Arbeiten sind in diesem Zu-

sammenhang ohne Interesse, da sie wegen der Einwirkung einer Reihe anderer Stoffe auf die Ergebnisse nicht die tatsächlichen Harnstoffkonzentrationen bestimmen.

Die erste Arbeit, die hier besprochen werden soll, wurde von Schöndorff[12]) ausgeführt, der den Harnstoff zu isolieren versuchte, indem er die stickstoffhaltigen Stoffe mit Ausnahme des Harnstoffs mittels Phosphorwolframsäure fällte. Im Filtrat bestimmte er dann den Harnstoff durch eine Kohlensäure- und Ammoniakbestimmung, indem da der Harnstoff sich zuerst in kohlensaures Ammoniak verwandelt. Schöndorff, der seine Bestimmungen an einem Hunde vornahm, den er einige Tage lang kräftig mit Fleisch fütterte, kam zu dem Ergebnis, daß die Harnstoffkonzentration für Blut, Leber, Milz, Pankreas und Gehirn annähernd gleich sei. In den Muskeln fand er weniger Harnstoff, dagegen fand er mehr Harnstoff im Herzen, was seiner Meinung nach von der dauernden Arbeitsleistung des Herzens herrührt. Wie die meisten, die sich mit der Frage beschäftigt haben, hielt er sich ausschließlich an das Gewebe, was sicher darauf zurückzuführen ist, daß die zur Verfügung stehende Methode so große Stoffmengen erforderte, daß es bei den meisten Sekreten nicht möglich war, ein ausreichendes Analysenmaterial von einem einzelnen Individuum zu erhalten, was ja für die Möglichkeit vergleichbare Bestimmungen zu erhalten, eine Bedingung ist. Der wesentlichste Fortschritt seiner Arbeit ist darin zu erblicken, daß er sich über die Notwendigkeit einer Isolierung des Harnstoffs klar war; daß es ihm nicht völlig gelang, darauf weisen verschiedene seiner Resultate hin.

Erstens liegen die für Harnstoff gefundenen Werte etwa 10mal so hoch wie der normale Wert. Dieses kann ja richtig gewesen sein, falls der Hund, den er bei seinen Bestimmungen verwendete, an Urämie litt, aber die hohe Konzentration im Herzen erklärt sich hierdurch nicht, und Schöndorffs eigene Erklärung ist nicht richtig. Die Ursache der gefundenen hohen Werte ist sicher die, daß die übrigen stickstoffhaltigen Stoffe nicht quantitativ gefällt wurden, was besonders für das Herz gilt.

Was die Muskeln anbelangt, steht es fest, daß die stickstoffhaltigen Stoffe nicht quantitativ gefällt wurden, sonst hätte Schöndorff nämlich gefunden, daß die Muskeln keinen Harnstoff enthalten, jedenfalls eine niedrigere als die von ihm angegebene Konzentration aufwies. Auf die nähere Erklärung hierfür werde ich auf einem späteren Stadium der Abhandlung zurückkommen. Obwohl Schöndorff die faktischen Harnstoffkonzentrationen nicht bestimmt hat, ist seine Arbeit doch deshalb bedeutungsvoll, weil er der erste ist, der sich darüber klar war, daß eine Isolierung des Harnstoffs nötig sei, um tatsächlichen Einblick in dessen Schicksal im Organismus gewinnen zu können.

Die bedeutendste Arbeit, die bisher über die Harnstoffkonzentration im Blute und den verschiedenen Organen und Sekreten veröffentlicht worden ist, wurde von Marshall und Davis[13]) ausgeführt. Die Bestimmungen wurden an 2 Hunden gemacht, von denen nach ihrer Tötung Proben aus verschiedenen Organen und Sekreten, doch im wesentlichen

aus Organen genommen wurden. Von Sekreten wurden nur aus der Galle und der Spinalflüssigkeit Proben genommen, was sicher darauf beruht, daß 3—5 ccm zu einer Bestimmung erforderlich sind, was für die meisten Sekrete eine Bestimmung einfach unmöglich macht. Marshall und Davis geben an, daß die Harnstoffkonzentration in allen Sekreten und Geweben mit Ausnahme der Fettgewebe und der mit der Harnausscheidung in Verbindung stehenden Organe annähernd gleich sei. Die zwischen den Harnstoffkonzentrationen in den verschiedenen Geweben und Sekreten gefundenen Unterschiede beruhen ihrer Meinung nach auf dem verschiedenen Wasser- und Fettgehalt der Gewebe, da sie in reinem Fettgewebe weniger Harnstoff als in den übrigen Organen fanden. Der größte Unterschied, den sie zwischen dem Blute und einem Organ mit Ausnahme des Fettgewebes fanden, beläuft sich auf 5 mg pro 100 ccm und zwischen den Organen sind Unterschiede von 7 mg pro 100 ccm vorhanden. Diese Unterschiede kann man nicht wie Marshall und Davis durch Analysenfehler erklären, da der größte Fehler, mit dem man rechnen muß, sich nur auf 2 mg pro 100 ccm beläuft. Auch kann der Wassergehalt in den Geweben nicht so stark variieren, daß die Unterschiede hierdurch erklärt werden könnten. Dagegen haben Marshall und Davis darin recht, daß der Fettgehalt der Gewebe Unterschiede wie die gefundenen bewirken kann, aber diese Erklärung stimmt nicht mit den gefundenen Analysenresultaten überein, da sie nämlich trotz ihrer Angabe, daß das Herz und Gehirn einen hohen, aber die Milz einen niedrigen Fettgehalt habe, für alle 3 Organe die gleiche Harnstoffkonzentration finden. Sie schließen die Diskussion damit ab, daß es keine praktische Bedeutung habe, ob absolut dieselbe Harnstoffkonzentration in den verschiedenen Organen und Sekreten vorhanden sei oder nicht.

Eigene Untersuchungen.

Während Schöndorff und Marshall - Davis wie genannt die Harnstoffkonzentration in einer Reihe von Organen und Sekreten desselben Tieres bestimmt haben, hielt ich mich bei meiner Arbeit über die Frage, wieweit zwischen dem Harnstoff im Blute und in den verschiedenen Organen und Sekreten des Organismus Gleichgewicht bestände, jedesmal an ein einzelnes Organ oder Sekret und machte so eine Anzahl Bestimmungen an Material von verschiedenen Individuen, bis ich die Frage für genügend beleuchtet hielt.

Die von mir an den einzelnen Organen und Sekreten gemachten Untersuchungen sind im folgenden in besonderen Abschnitten beschrieben, indem jedes einzelne Organ oder Sekret für sich behandelt ist.

In folgenden Sekreten und Organen bestimmte ich den Harnstoff:

Sekrete	Organe
Spinalflüssigkeit	Muskeln
Galle	Leber
Kammerwasser	Herz
Magensaft	Milz
Speichel	Nierenfett
Schweiß	Eingeweidefett
Tränen	

Spinalflüssigkeit.

Die Untersuchungen wurden an Spinalflüssigkeit von Hunden vorgenommen. Die Spinalflüssigkeit wurde durch Punktur entnommen, nachdem der Hund getötet und abgehäutet war.

Es war recht schwierig, an kleinen Hunden Punktur vorzunehmen, während dieses bei größeren Hunden keine Schwierigkeiten bereitete.

Nur in einem Falle war die Spinalflüssigkeit leicht von Blut gefärbt.

Wie die Resultate in der untenstehenden Tabelle zeigen, besteht dieselbe Harnstoffkonzentration im Blute wie in der Spinalflüssigkeit und dieses bedeutet, daß zwischen der Harnstoffkonzentration im Blute und in der Spinalflüssigkeit Gleichgewicht besteht, da der Verteilungskoeffizient zwischen dem Plasma und der Spinalflüssigkeit 1 ist. Gleichzeitig machte ich eine einzelne Ammoniakbestimmung, die das Resultat ergab, daß die gleiche Konzentration vorhanden war, die normalerweise im Blute vorkommt.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
	Blut	Spinalflüssigkeit	
	14,8 mg	14,7 mg	
	12,1 „	12,0 „	
	13,6 „	13,8 „ (schwach von Blut gefärbt)	
	13,0 „	13,2 „	0,6 mg
Mittel	13,4 mg	13,4 mg	

Blasengalle.

Die Untersuchungen über die Harnstoffkonzentrationen in der Galle wurden teils an Ochsengalle und teils an Hundegalle vorgenommen.

Bei den Bestimmungen verfuhr ich in der in meiner Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Blut beschriebenen Weise, indem ich vor der Bestimmung des Harnstoffs die Farbstoffe ausfällte. Namentlich bei der Hundegalle erwies es sich als nötig, die Farbstoffe völlig auszufällen. Anfangs fand ich in der Hundegalle niedrigeren Harnstoff als im Blute, aber es stellte sich heraus, daß dies auf einer ungenügenden Ausfällung des Farbstoffes beruhte, so daß er Sauerstoff aufnahm, wenn Bromnatron zugesetzt wurde, was ja zur Folge hat, daß die Manometerausschläge zu klein werden.

Wie aus den Resultaten ersichtlich ist, besteht zwischen der Harnstoffkonzentration in der Galle und im Blute Gleichgewicht.

Gleichzeitig habe ich einzelne Ammoniakbestimmungen gemacht, wo ich, wie die Tabelle zeigt, die normaliter im Blute vorkommende Konzentration fand.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
	Blut (Ochse)	Galle	
	16,9 mg	17,3 mg	0,6 mg
	11,0 „	10,9 „	
	25,5 „	25,4 „	
	10,2 „	10,0 „	0,4 „
	Blut (Hund)	Galle	
	20,8 mg	20,9 mg	0,4 „
	13,6 „	13,3 „	
Mittel	16,3 mg	16,3 mg	

Kammerwasser.

Anfangs machte ich einige Bestimmungen an Ochsenaugen, die ich von der Schlachthalle erhielt.

Es zeigte sich hierbei, daß ich bisweilen Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Kammerwasser und im Blute erhielt und bisweilen nicht. Bei mehreren Bestimmungen fand ich weniger Harnstoff im Kammerwasser als im entsprechenden Blut, wogegen das umgekehrte Verhältnis niemals vorlag. Als ich zum ersten Male zu wenig erhielt, meinte ich, daß dieses darauf beruhen könne, daß das Kammerwasser sich bei Entnahme der Probe mit Flüssigkeit des Glaskörpers gemischt hätte, da meiner Meinung nach die Diffusionsbedingungen im Glaskörper verhältnismäßig ungünstig waren, so daß es denkbar wäre, daß durch eine Steigerung der Harnstoffkonzentration im Blute noch kein Gleichgewicht zwischen dem Glaskörper und dem Blute zustandegekom-

men war. Aber da ich andauernd weniger Harnstoff im Kammwasser als im Blute fand, mußte ich diese Erklärung fallen lassen.

Um indessen sicher sein zu können, daß die Entnahme der Probe unter sichernden Umständen stattfände, nahm ich selbst die Probe von Hunden, die auf der landwirtschaftlichen Hochschule getötet wurden.

Ich verfuhr in der Weise, daß ich gleich nach Tötung der Hunde eine Blutprobe nahm. Darauf nahm ich so schnell wie möglich eine Probe des Kammerwassers, indem ich eine spitze Glaspipette durch die Cornea einführte. Um nicht zu tief zu stecken und zu vermeiden vom Glaskörper stammende Flüssigkeit mit in die Probe hineinzubekommen, band ich einen Faden ca. 2 mm von der Spitze fest um die Pipette. Die Analysen ergaben dasselbe Ergebnis wie bei den früheren Bestimmungen, nämlich, daß bisweilen Gleichgewicht besteht und bisweilen nicht, aber in diesem Falle immer weniger Harnstoff in dem Kammerwasser.

Auf Grund dieser Versuche hielt ich mich zu dem Schlusse berechtigt, daß, wenn ich bisweilen weniger Harnstoff in dem Kammerwasser als im Blute fand, dieses darauf beruhe, daß die Erneuerung des Kammerwassers so lebhaft gewesen war, daß der Harnstoff mit der Ausscheidung des Wassers nicht gleichen Schritt halten konnte.

Um festzustellen, ob dieses sich so verhielte oder um evtl. Klarheit darüber zu gewinnen, wie das Verhältnis sei, machte ich einige Versuche an chloralbetäubten Pferden, denen ich nach Punktieren der Cornea eine Reihe von Proben entnahm. Beim Punktieren fand eine sehr lebhafte Sekretion statt, was ja für die Klärung der Frage gute Bedingungen geben sollte. Nun verändert das Kammerwasser ja bekanntlich nach dem Punktieren völlig ihren Charakter, denn die Proteinmenge steigt, während die Sekretion gleichzeitig zunimmt: die Diffusionsverhältnisse sind also von den normalen völlig verschieden.

Folglich kann man nicht direkt einen Schluß über die Diffusion des Harnstoffs im Kammerwasser unter normalen Verhältnissen aus den von mir an Pferden gemachten Versuchen ziehen, aber sie bestätigen die Theorie indirekt, da der Harnstoff bei den von mir gemachten Versuchen anfänglich im Kammerwasser niedriger war als im Blut, wonach mit der gleichzeitigen Steigerung der Proteinstoffkonzentration eine Steigerung der Harnstoffkonzentration stattfand, bis Gleichgewicht mit dem

Blute bestand. Wenn das Gleichgewicht eingetreten war, hielt es sich während des ganzen Versuches konstant, so daß ich selbst unter diesen Bedingungen nie eine höhere Harnstoffkonzentration im Kammerwasser als im Blute fand.

Dieses muß sicher so erklärt werden, daß das Kammerwasser sich meistens so schnell erneuert, daß der Harnstoff bei normalen Diffusionsbedingungen der Diffusion des Wassers nicht folgen kann. Ändern die Verhältnisse sich indessen, so daß verhältnismäßig große Proteinstoffmengen ebenfalls diffundieren können, werden die Diffusionsbedingungen für den Harnstoff so gut, in daß völlige Gleichgewicht sich einstellt.

Bei den Versuchen verfuhr ich in der Weise, daß ich nach Betäubung des Tieres eine Blutprobe nahm und darauf die Cornea mittels einer Pipette in der bei den Versuchen mit Hunden beschriebenen Weise punktierte, wodurch sogleich das Kammerwasser in die Pipette hochstieg. Die Pipette wurde dann herausgenommen und in ein Zwergreagenzglas geleert, wonach die Pipette eiligst in dasselbe Loch der Cornea gebracht wurde. Es war notwendig, die Pipette jedesmal nach Entnahme einer Probe zu wechseln, da diese sich sonst verstopfte, indem die Proteinstoffe an der Spitze koagulierten. Dieses verhinderte ich, indem ich etwas feines pulverisiertes oxalsaures Kali durch jede Pipette blies, bevor ich sie in das Auge einführte. Am Ende des Versuches nahm ich wieder eine Blutprobe.

In der untenstehenden Tab. I habe ich die Ergebnisse der am Kammerwasser von Hundeaugen und Ochsenaugen gemachten Bestimmungen angeführt. In der Tab. II habe ich die Ergebnisse meiner Versuche an Pferdeaugen angeführt.

Tabelle I.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm

	Ochsenblut mg	Kammerwasser mg	Hundeblut mg	Kammerwasser mg
	13,6	13,2—13,3	12,5	8,6—8,7
	19,0	11,5—11,4	14,4	9,3
	25,5	25,4	60,9	52,4
	10,2	10,0— 9,9	12,1	12,0
	17,0	17,1	13,2	8,8
	20,8	20,7	11,1	6,7
	23,0	20,6	17,0	17,1
Mittel	18,8	16,9	20,1	16,4

Tabelle II.

Versuch 1:

Zeit	Blut	Kammerwasser
	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
$12^h\,30'$	32,3 mg	28,0 mg
$12^h\,55'$		29,7 „
$1^h\,45'$		33,0 „
$2^h\,5'$		32,7 „
$2^h\,20'$	32,5 „	32,9 „

Versuch 2:

Zeit	Blut	Kammerwasser
	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
$12^h\,40'$	27,9 mg	24,2 mg
$12^h\,50'$		26,0 „
$1^h\,5'$		27,1 „
$1^h\,25'$		27,9 „
$1^h\,35'$	27,5 „	28,0 „

Magensaft.

Ich begann mit dem Magensaft von Hunden, die auf der landwirtschaftlichen Hochschule getötet wurden. Damit kein Mageninhalt vorhanden sein sollte, der die Proben verunreinigen könnte, wurden die Hunde in den letzten zehn Stunden vor der Tötung nicht gefüttert. Um die Sekretion in Gang zu bringen, erhielten sie unmittelbar vor ihrem Tode ein Stück Fleisch und etwas Zucker. Nachdem das Tier getötet worden war, nahm ich eine Blutprobe, worauf ich sogleich den Magensack öffnete und eine Probe des Magensaftes nahm, der in den meisten Fällen ganz rein und klar war.

In den Fällen, wo ich einen Mageninhalt vorfand, machte ich von der Probe keinen Gebrauch. Bei allen Bestimmungen fand ich, wie untenstehende Tabelle zeigt, Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Magensaft und im Blute.

	Blut	Magensaft
	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
	14,8 mg	14,6 mg
	12,1 „	12,9 „
	13,2 „	13,8 „
Mittel	13,4 mg	13,8 mg

Da es mir indessen auf diesem Stadium meiner Arbeit klar wurde, daß es auf der Schnelligkeit beruhe, mit der das betreffende Sekret sezerniert wurde, ob ich Gleichgewicht zwischen irgend-

einem Sekret und dem Blute fand, benutzte ich eine sich mir bietende Gelegenheit, einige Bestimmungen am Magensafte eines Hundes zu machen, in dessen Magensack eine Kanüle eingeführt wurde. Indem ich den Hund mit Fleisch fütterte oder ihm eine Pilocarpininjektion gab, erzielte ich eine lebhafte Sekretion des Magensaftes. In geeigneten Zwischenräumen nahm ich Proben vom Magensaft.

Am Ende des Versuches nahm ich ebenfalls eine Blutprobe vom Ohre. Es zeigte sich hierbei, daß am Anfang des Versuches Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration des Blutes und der des Magensaftes bestand, während späterhin die Konzentration im Magensaft fiel. Gegen Ende des Versuches, als die Sekretion nicht so lebhaft war, fand eine Steigerung der Harnstoffkonzentration statt, was ja deutlich zeigt, daß die Schnelligkeit, mit der die Sekretion vor sicht geht, für das Vorhandensein des Gleichgewichtes entscheidend ist.

Außer den Harnstoffbestimmungen machte ich ebenfalls einige Ammoniakbestimmungen am Magensaft, die dieselbe Konzentration ergaben, die normalerweise im Blute vorkommt. Bei meinem ersten Versuch fand ich eine sehr große Ammoniakkonzentration, doch beruhte dieses meiner Feststellung nach darauf, daß das Fleisch, mit dem der Hund gefüttert wurde, verdorben war und deshalb Ammoniak an den Magensaft abgab. Die durch diesen Versuch erhaltenen Ergebnisse ließ ich unberücksichtigt.

Beim nächsten Versuch wurde frisches Fleisch verwendet, worauf ich für das Ammoniak Werte fand, die mit denen des Blutes übereinstimmten. Das Verfahren bei diesen Versuchen war folgendes:

Zuerst wurde der Magensack mit Wasser ausgespült, indem ein Schlauch durch das Speiserohr in den Magensack eingeführt wurde, aus dem das Wasser durch die Kanüle abfloß. Nachdem der Magensack gut ausgespült und das Wasser abgetröpfelt war, verschlang das Tier ein Stück Fleisch, worauf eine lebhafte Sekretion begann. Einige Minuten, nachdem die Sekretion in Gang gekommen war, nahm ich die erste Probe, indem ich das Zwergreagenzglas dicht an die Kanüle hielt. Während des Versuches nahm ich in geeigneten Zwischenräumen Proben.

Die gesamte Sekretion belief sich während des ganzen Versuches auf etwa 15—20 ccm. In untenstehender Tabelle habe ich

die Ergebnisse eines Versuches angeführt, der am Hunde nach dessen Fütterung mit Fleisch gemacht wurde.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blut	Zeit	Magensaft	Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
9,3—9,5 mg	11h 30′	9,8 mg	0,4 mg
	11h 45′	7,6 „	
	11h 55′	5,1 „	
	12h 5′	4,3 „	
	12h 15′	5,3 „	
	12h 25′	5,3 „	
	12h 40′	4,8 „	0,6 „

In untenstehender Tabelle, habe ich die Werte eines Versuches nach einer Pilocarpininjektion angeführt. Ich gab subcutant 0,004 g Pilocarpinchlorid. Eine halbe Stunde nach der Injektion begann die Sekretion, worauf ich sogleich eine Probe nahm. In geeigneten Zwischenräumen nahm ich dann Proben während Verlauf des ganzen Versuches.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm Blut	Zeit	Magensaft	Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
10,4 mg	11h 50′	10,9 mg	0,3 mg
	12h 10′	7,1 „	
	12h 20′	4,8 „	
	12h 35′	4,9 „	
	12h 55′	4,5 „	
	1h 10′	6,1 „	0,6 „

Die Versuche wurden auf dem physiologischen Laboratorium der Universität vorgenommen.

Für die Erlaubnis, den Hund zu meinen Versuchen benutzen zu dürfen, spreche ich Herrn Dr. Einar Thomsen meinen herzlichsten Dank aus.

Speichel.

Anfänglich versuchte ich, Speichel von Hunden zu erhalten, indem ich ihnen, kurz bevor sie getötet wurden, Sand in den Mund goß. Als ich aber den Speichelgang frei dissekierte, stellte es sich heraus, daß nicht genügend Speichel zu einer Probe vorhanden war. Dasselbe negative Ergebnis erhielt ich, wenn ich Pilocarpin subcutan gab, trotzdem das Tier sehr lebhaft sezernierte. Ich ging deshalb dazu über, Bestimmungen an Speichel von Menschen zu machen. Um vollständig reinen Speichel zu

erhalten, der nicht von der Mundhöhle verunreinigt worden war, versuchte ich den Speichel direkt von dem Speichelausführungsgang zu nehmen. Zu diesem Zwecke brachte ich über dem Ausführungsgang der Speicheldrüse (Parotis) eine kleine Glasschale an, an die ein winkelförmiges Rohr von einer solchen Länge angeblasen worden war, daß es aus dem Munde herausragte, wenn die Schale über den Ausführungsgang gebracht wurde. Setzte man das Glasrohr mit einem Wassersauger in Verbindung, schloß sich die Glasschale bei schwachem Saugen ganz dicht an die Backe an.

Wenn die Glasschale festsaß, erhielt die Versuchsperson etwas zu essen, und ich erwartete, daß dann Speichel in das Glasrohr fließen sollte. Es stellte sich jedoch trotz wiederholter Versuche an verschiedenen Individuen heraus, daß es nicht möglich sei, den Speichel in dieser Weise anzusammeln, da so gut wie kein Speichel in das Rohr floß.

Ich ging deshalb dazu über, Speichel direkt aus der Mundhöhle zu sammeln, indem ich die Versuchspersonen in ein Zwergreagenzglas spucken ließ.

Die Analysen ergaben das Ergebnis, daß Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff im Blute und im Speichel besteht, aber außerdem fand ich eine recht hohe Ammoniakkonzentration, welche die normale im Blute vorkommende Konzentration um ein Mehrfaches überstieg.

Um Klarheit darüber zu gewinnen, ob das Ammoniak vom Verwesungsprozesse in der Mundhöhle herrühre, was ja von vornherein das Wahrscheinlichste war, oder ob wirklich eine so hohe Ammoniakkonzentration im Speichel vorhanden sei, ließ ich die Mundhöhle vor Ansammlung des Speichels gründlich reinigen. Es stellte sich hierdurch heraus, daß der Speichel dieselbe Ammoniakkonzentration wie das Blut enthält, aber dafür fand ich bei diesem Verfahren bisweilen eine niedrigere Harnstoffkonzentration im Speichel als im Blute.

Die Erklärung hierfür ist, daß man es nicht unterlassen kann, während der Reinigung der Mundhöhle Speichel zu sezernieren. Schon wenn man vom Speichel spricht, beginnt augenblicklich die Sekretion, und wenn man endlich die Probe nimmt, hat infolgedessen eine so lebhafte Sekretion stattgefunden, daß der Harnstoff der Wasserabsonderung nicht folgen konnte.

Die in untenstehendem Schema angegebenen Versuchsergebnisse zeigen, daß zwischen der Harnstoffkonzentration im Speichel und Blute Gleichgewicht besteht, und daß dieselbe Ammoniakkonzentration wie im Blute vorhanden ist. Wird die Sekretion sehr lebhaft, kann der Harnstoff nicht mitfolgen, und man findet dann niedrigere Werte für den Harnstoff.

Versuch 1: Versuchsperson K. L. G. A.

Speichel, der unmittelbar der Mundhöhle entnommen wurde, ohne daß diese zuvor gereinigt worden war.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff
	Blut	Speichel	pro 100 ccm Speichel
	19,2 mg	19,8 mg	3,9 mg
	19,0 „	18,9 „	2,4 „
Mittel	19,1 mg	19,4 mg	

Versuch 2: Versuchsperson K. L. G. A.

Der Mund wurde vor Entnahme der Probe gereinigt und getrocknet.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff
	Blut	Speichel	pro 100 ccm Speichel
	19,0 mg	18,6 mg	0,3 mg
	19,5 „	17,3 „	0,6 „
Mittel	19,3 mg	18,0 mg	

Versuch 3: Versuchsperson A. K.

Der Mund wurde vor Entnahme der Probe gereinigt und getrocknet.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff
Blut	Speichel	pro 100 ccm Speichel
16,8 mg	15,6 mg	0,5 mg

Versuch 4: Versuchsperson E. G. A.

Der Mund wurde gereinigt und getrocknet, worauf die Versuchsperson einige Male ausspuckte, bevor die Probe genommen wurde.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
Blut	Speichel
14,2 mg	12,4 mg

Milch.

Die Bestimmungen wurden an Kuhmilch gemacht, die ich von der Viehhalle erhielt, wo von den Tieren eine Milchprobe unmittelbar vor und eine Blutprobe gleich nach ihrer Tötung genommen wurde. Bei der Bestimmung an Milch wurde zuerst das Casein, durch Zusatz von Essigsäure zur Milch, die zuvor mit Wasser verdünnt worden war, ausgefällt. Das ausgeschiedene Casein wird abfiltriert und das Filtrat bis zum Kochen erwärmt.

Die Proteinstoffe werden darauf durch dasselbe Filter abfiltriert, das bei der ersten Filtration verwendet wurde.

Wie aus untenstehender Tabelle ersichtlich ist, besteht Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff im Blute und in der Milch. Um feststellen zu können, ob der Harnstoff bei lebhafter Milchsekretion abnimmt, nahm ich während des Melkens einige Proben mit einem Zwischenraum von zwei Minuten. Es zeigte sich, daß die Harnstoffkonzentration sich während des ganzen Versuches auf der gleichen Höhe hielt, was ja bedeutet, daß die Diffusionsbedingungen für Harnstoff in den Milchdrüsen besonders günstig sind.

Indessen kann aus diesem Versuche nichts geschlossen werden, da die Milchsekretion sehr spärlich war.

Um in dieser Frage Klarheit zu verschaffen, ist es erforderlich, Milch von einer Kuh mit einer sehr lebhaften Milchsekretion zu nehmen, doch da es mir nicht gelungen ist, eine solche Kuh in der Viehhalle zu finden, habe ich den Versuch vorläufig aufgegeben.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
	Blut	Milch
	12,5 mg	12,4—12,6 mg
	23,6 „	23,8—23,4 „
	21,4 „	21,8 mg
	18,4 „	19,0 „
	14,9 „	14,5 „
	14,0 „	14,1 „
Mittel	17,4 mg	17,6 mg

Schweiß.

Die Bestimmungen wurden an Menschenschweiß und teils an Katzenschweiß vorgenommen, bei den letzteren nach einer Pilocarpininjektion.

Bei den Versuchen an Menschen wurde der Schweiß in einer Glasmanschette angesammelt, die an dem einen Arm fest angeschlossen wurde, so daß keine Verdunstung stattfinden konnte, wodurch eine Konzentration des Schweißes eingetreten wäre, was ja in diesem Falle, wo ein Vergleich der Harnstoffkonzentration im Schweiß und im Blut bezweckt wird, von prinzipieller Bedeutung ist.

Das eine Ende der Glasmanschette wurde mit einem durchlöcherten Stöpsel abgeschlossen, in dem ein Glasrohr angebracht

war, durch welches der angesammelte Schweiß am Ende des Versuches in ein Zwergreagenzglas hineinlief.

Während des Versuches wurde das Glasrohr mittels eines Pfropfens verschlossen gehalten. Um das andere Ende der Glasmanschette, durch das der Arm eingeführt werden sollte, wurde mittels einiger Gummibänder ein Stück Batist gespannt, das von genügender Länge war, um die Manschette mittels einiger Gummibänder fest gegen den Arm abschließen zu können. Anfangs versuchte ich durch Versuche an mir selbst, die Schweißsekretion in Gang zu bringen, indem ich den Arm mit der Glasmanschette im Wasser mit einer Temperatur von etwa 50° brachte. Obgleich ich gleichzeitig durch Öffnen und Schließen der Hand Muskelbewegungen vornahm, erreichte ich nicht die geringste Schweißsekretion. Ich gab deshalb die Methode auf und machte die weiteren Versuche in der Badeanstalt „Kopenhagen", wo ich die Versuchspersonen ein „halb russisches Bad" nehmen ließ.

Es wurden Versuche mit 3 verschiedenen gesunden Individuen im Alter von 20—35 Jahren gemacht. Mit der einen Versuchsperson wurde der Versuch wiederholt.

Das Verfahren bei den Versuchen, das für alle 3 Individuen das gleiche war, bestand in folgendem:

Um keinen Schweiß in der Manschette anzusammeln, der sich lange Zeit in den Poren aufgehalten hatte, wodurch ja teils eine Verwandlung des Harnstoffs in Ammoniak und teils eine Konzentration des Schweißes denkbar geworden wäre, ließ ich zuerst die Versuchsperson ohne die Manschette in den Dampfraum gehen.

Die Temperatur des Dampfraumes schwankte zwischen 46 bis 48°, so daß also eine Verdichtung des Schweißes hier nicht in Frage kommen könnte.

Die Schweißsekretion begann immer sofort auf der Stirn und auf der Brust, wogegen es jedesmal einige Minuten dauerte, bis die Sekretion am Arm begann. Nachdem die Sekretion am Arm einige Minuten gedauert hatte, ging die Versuchsperson aus dem Dampfraum hinaus. Der Arm wurde dann gründlich mit warmem Wasser gespült, abgetrocknet und darauf in der früheren Weise in die Manschette gebracht, worauf die Versuchsperson gleich wieder in den Dampfraum hineinging.

Um die Sekretion zu fördern, wurden Muskelbewegungen durch Öffnen und Schließen der Hand vorgenommen. Die Manschette wurde während der ganzen Zeit senkrecht gehalten, um eine Ansammlung des Schweißes am Ablaufrohr zu erreichen. Nach Ablauf von 5—10 Minuten, was für die verschiedenen Individuen etwas abweichend war, hatten sich 2 ccm Schweiß angesammelt. Hiernach ging die Versuchsperson aus dem Dampfbad hinaus, der das Ablaufrohr verschießende Pfropfen wurde entfernt, und der Schweiß in ein Zwergreagenzglas hinübergeleitet.

Bei dem ersten Versuch nahm ich eine Blutprobe vor und nach dem Bade, aber da sie das gleiche Resultat ergaben, begnügte ich mich damit, eine Blutprobe zu nehmen, unmittelbar nachdem die Versuchsperson den Dampfraum verlassen hatte. Wie aus den in untenstehender Tabelle angeführten Ergebnissen hervorgeht, besteht kein Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff im Blute und dem Schweiß, und zwar ist die Harnstoffkonzentration im Schweiße größer als im entsprechenden Blute. Bei den Schweißdrüsen handelt es sich also nicht um eine einfache Diffusion, sondern um aktive Ausscheidung von Harnstoff.

Die Ammoniakkonzentration im Schweiße ist dagegen die gleiche wie im Blut, was besagt, daß der Ammoniak im Gegensatz zum Harnstoff nach physischen Gesetzen diffundiert.

Versuch 1: Versuchsperson K. L. G. A.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
Blut vor dem Bade	Schweiß	Schweiß
29,0 mg	42,9 mg	0,4 mg
	42,8 „	
Blut nach dem Bade		
29,1 mg		

Versuch 2: Versuchsperson K. L. G. A.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
Blut	Schweiß
24,5 mg	44,1 mg

Versuch 3: Versuchsperson E. G. A.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		Ammoniakstickstoff pro 100 ccm
Blut	Schweiß	Schweiß
20,8 mg	51,6 mg	0,6 mg
	51,4 „	

Versuch 4: Versuchsperson J. A.

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
	Blut	Schweiß
	17,5 mg	36,4 mg
Mittel	22,9 mg	44,9 mg

Wie schon erwähnt, machte ich ebenfalls Versuche mit Katzen, wobei ich in der Weise verfuhr, daß ich das Tier in ein Netz brachte und dann betäubte, indem ich Urethan subcutan gab, das ich in Ringers Flüssigkeit aufgelöst hatte. Darauf injizierte ich Pilocarpinchlorid. Ich hatte zuvor festgestellt, daß Bromnatron nicht mit Urethan reagiert.

Von den beiden Katzen, die ich bei den Versuchen verwendete, war die eine ein ganz junges und die andere ein älteres Tier. Bei beiden zeigte sich die merkwürdige Erscheinung, daß die Urethanmenge, die sonst ausreichend zu sein pflegt, um die Narkose hervorzurufen, 1,5—2 g pro Kilogramm, so gut wie wirkungslos war. Erst nachdem ich ca. 4 g pro Kilogramm gegeben hatte, trat die Narkose ein. Der Schweiß der Pfote wurde angesammelt, indem diese in ein großes Reagenzglas gebracht wurde, das mit einer Kappe versehen war, durch die Wasser mit einer Temperatur von ca. 40° strömte, teils um durch Erwärmung der Pfote die Schweißsekretion zu vergrößern, teils um zu verhindern, daß der Schweiß am kalten Glas destillierte, wodurch man einen falschen Ausdruck für die Harnstoffkonzentration erhalten würde.

Das Tier befand sich während des Versuches auf einem Operationstisch in der Weise, daß die Pfote, die in der Manschette stak, senkrecht nach unten hing, so daß der ausgeschiedene Schweiß sich am Boden sammelte. Die Manschette wurde mittels eines Stückes Batist und einiger Gummibänder in der beim Versuche an Menschen beschriebenen Weise verschlossen. Damit das Tier seine Temperatur während der Narkose bewahren könne, wurde es zugedeckt und unter dem Operationstisch zwei Glühlampen befestigt, die so reguliert wurden, daß die Temperatur der Katze während des ganzen Versuches normal war.

Versuch 1: Gewicht der Katze 2 kg.

	Zeit	
Äthylurethan subcutan . . .	$11^h 35'$	4 g
	$11^h 55'$	1,5 g
	$12^h 10'$	1,5 g
	$12^h 20'$	1 g

Temperatur der Katze 38,2°.

Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier auf den Operationstisch gelegt und die Manschette an die Pfote festgespannt, worauf ich 0,1 ccm 1 proz. Pilocarpinlösung gab.

Nach Verlauf einiger Minuten trat eine reichliche Speichelsekretion und etwas später die Tränensekretion ein, während keine Schweißsekretion in Gang kam.

Eine halbe Stunde nach Beginn des Versuches gab ich weitere 0,1 ccm der Pilocarpinlösung, worauf eine schwache Schweißsekretion begann.

Eine Stunde, nachdem ich zum erstenmal Pilocarpin gegeben hatte, nahm ich die Manschette ab und saugte den Schweiß in eine Mikropipette auf, worauf ich die Manschette wieder schleunigst an der Pfote befestigte. Der ausgeschiedene Schweiß betrug 0,2 ccm.

Etwa 20 Minuten darauf trat der Tod ein, worauf sogleich eine Blutprobe genommen wurde. Der Schweiß wurde genau wie zuvor in eine Mikropipette gesaugt, die 0,08 ccm anzeigte.

Die Temperatur war während des ganzen Versuches normal.

Der Tod ist wahrscheinlich dem Pilocarpin zuzuschreiben.

Bei der Bestimmung der Harnstoffkonzentration im Schweiße und im Blute ergab es sich, wie aus dem untenstehenden Schema ersichtlich ist, daß übereinstimmend mit den an Menschen gemachten Versuchen kein Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Schweiße und im Blute besteht, denn auch hier wies der Schweiß eine höhere Harnstoffkonzentration als das Blut auf.

Die Ergebnisse zeigen zugleich, daß die Konzentration während des Versuches stieg, was besagt, daß es sich bei den Schweißdrüsen nicht um eine einfache Diffusion, sondern um aktive Ausscheidung von Harnstoff handelt.

Harnstoffstickstoff pro 100 ccm

Zeit	Blut	Schweiß
1^h 15′	27,4 mg	
1^h 40′		54,6 mg
2^h 5′	27,9 „	60,7 „

Beim Versuch II verfuhr ich ganz wie in der beim Versuch I beschriebenen Weise, nur nahm ich außerdem einige Proben vom Speichel, der während des ganzen Versuches sehr lebhaft sezerniert wurde. Doch nahm ich bei diesem Versuch die Speichelproben an und für sich nicht, um die Harnstoffkonzentration des Speichels und Blutes zu vergleichen, was ja schon durch meine vorhergehenden Untersuchungen geschehen war, sondern um möglicherweise eine Erklärung dafür zu erhalten, weshalb ich

bei den von mir gemachten Versuchen bisweilen Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration des Blutes und der des Speichels fand und bisweilen nicht. Um keinen durch die Verwesungsprozesse in der Mundhöhle entstandenen Ammoniak mit in die Proben zu erhalten, wartete ich mit der Aufsammlung des Speichels, bis die Mundhöhle gut ausgespült war. Wie die Ergebnisse zeigen, fiel die Harnstoffkonzentration während des ganzen Versuches. Nur gegen Ende des Versuches, als die Sekretion nicht mehr so lebhaft war, fand wieder eine Steigerung statt, ohne jedoch die Harnstoffkonzentration des Blutes annähernd zu erreichen.

Daß ich bei meinen früheren Versuchen kein Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Blute und im Speichel fand, beruht also darauf, daß der Harnstoff bei sehr lebhafter Sekretion mit der Absonderung des Speichels nicht gleichen Schritt halten kann.

Versuch 2: Das Gewicht der Katze betrug 4,3 kg.

	Zeit	
Äthylurethan subcutan . . .	11^h 50′	8 g
	12^h 10′	4 „
	12^h 25′	4 „
1 proz. Pilocarpinchloridlösung	1^h	0,1 ccm
	1^h 30′	0,05 „
Mors	2^h	

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm		
Zeit	Blut	Speichel	Schweiß
1^h 30′	40 mg		
1^h 40′		25 mg	48 mg
1^h 50′		18 „	
2^h	39,6 „	27 „	59 „

Tränen.

Anfänglich versuchte ich Tränen von Menschen zu erhalten, doch erwies es sich als unmöglich, sie in einer eine Verdunstung ausschließenden Weise anzusammeln.

Ich machte den Versuch, Tränen von Frauen anzusammeln, die mir im voraus erzählt hatten, daß ihnen beim Zwiebelschneiden die Tränen die Backen hinunterliefen.

Bei den Versuchen zeigte es sich jedesmal, daß die Tränen, die nicht im Tränenkanal verschwanden, solange in den Augenwimpern hängenblieben, daß ich mich nicht darauf verlassen

konnte, daß eine die Harnstoffkonzentration beeinflussende Verdunstung nicht stattgefunden habe. In einem Falle gelang es mir, Tränen von einer Person anzusammeln, deren Tränenkanal verstopft war, aber sogar in diesem Fall glaubte ich mich nicht darauf verlassen zu können, daß eine Verdampfung beim Eintritt der Tränen in das unter das Auge gehaltene Zwergreagenzglas nicht stattgefunden habe.

Die Analyse ergab nämlich das Resultat, daß in Tränen eine höhere Harnstoffkonzentration als im Blute vorhanden sei.

Da bei den an Katzen vorgenommenen Versuchen, durch die ich die Harnstoffkonzentration im Schweiße bestimmte, eine sehr lebhafte Tränensekretion stattfand, benutzte ich die Gelegenheit, zwecks Kontrolle des erhaltenen Resultates Tränen in einer Weise anzusammeln, die eine Verdunstung während des Versuches unmöglich machte.

Ich hielt eine in wagerechter Lage befindliche Pipette in den Augenwinkel gerade auf den Bulbus, so daß die Tränen direkt in die Pipette flossen. Das Augenlid der Katze war geschlossen, so daß keine Verdunstung stattfinden konnte. Als die Pipette bis zum Zeichen 0,2 gefüllt war, wurde sie gewechselt, und von neuem 0,2 ccm angesammelt.

Dieses geschah während des Versuches dreimal. Bei der Analyse ergab es sich, wie untenstehende Tabelle ersichtlich macht, daß kein Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff in Tränen und Blut bestand, sondern daß die Harnstoffkonzentration der Tränen höher war, und daß die Konzentration während des Versuches stieg. Bei den Tränendrüsen handelt es sich also nicht um eine einfache Diffusion, sondern vielmehr um eine aktive Ausscheidung von Harnstoff.

Versuch 1:

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
Zeit	Blut	Tränen
1^h 15′	27,4 mg	36,4 mg
1^h 40′		44,2 „
2^h 5′	27,9 „	48,5 „

Versuch 2:

	Harnstoffstickstoff pro 100 ccm	
Zeit	Blut	Tränen
1^h 30′	40,0 mg	42,8 mg
2^h 10′	39,9 „	48,0 „

Muskeln.

Bei den Bestimmungen an Geweben habe ich, wie schon erwähnt, die Ureasemethode in der von Cullen und van Slyke modifizierten Form verwendet.

Zuerst entzog ich den Harnstoff und das Ammoniak mittels Alkohol, indem ich das Gewebe erst mit Sand in einem Mörser zerrieb und dann mit Alkohol (96%) übergoß. Nach Verlauf einer halben Stunde filtrierte ich den Niederschlag ab und wusch ihn mit ca. 50 ccm Alkohol aus.

Zu dem Filtrat wurde 10 ccm einer Lösung von primären phosphorsauren Kali (6 bis 1000 g) gesetzt, teils um das Ammoniak zu binden, teils um die Aktivität der Urease gegenüber dem Harnstoff zu vergrößern.

Die Mischung wurde in eine Petrischale gegossen und in einen Trockenschrank gestellt, wo warme Luft über und unter die Schale wehte und dadurch die Verdunstung des Alkohols bewirkte.

Die Wärme regulierte ich so, daß die Temperatur in der Schale 25° nicht überstieg, da ja bekanntlich bei einer Temperatur von ca. 30° eine Verwandlung des Harnstoffs in Ammoniak erfolgt. Als eine geeignete Menge verdunstet und noch ca. 20 ccm Flüssigkeit übrig war, goß ich diese in ein Meßglas, spülte die Petrischale mit Wasser aus und goß auch dieses in das Meßglas.

An der einen Hälfte der Flüssigkeit machte ich dann eine Harnstoffbestimmung und an der anderen Hälfte eine Ammoniakbestimmung. Das Ammoniak bestimmte ich wie gewöhnlich, indem ich nach Zusetzung von kohlensaurem Kali Luftblasen durch die Flüssigkeit trieb.

Die ersten Bestimmungen nahm ich an Muskelgewebe von Hunden vor, wo ich wie oben beschrieben unmittelbar nach Tötung des Tieres den Muskel ausdessikierte. Die Analysen ergaben das überraschende Resultat, daß im Muskel eine niedrigere Harnstoffkonzentration als im Blute, doch andererseits im Muskel eine höhere Ammoniakkonzentration als im Blut vorhanden war, sowie das die Summe von Harnstoff + Ammoniak im Muskel gleich der Summe von Harnstoff + Ammoniak im Blute war. Bei Durchsicht der Literatur fand ich, daß überall höhere Werte für Ammoniak im Gewebe als die normalerweise im Blute vorkommenden Mengen angegeben wurden. Die Ammoniakmenge

des Blutes ist, wie die Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, sehr klein, und ziemlich konstant und beträgt normalerweise von 0,25—0,5 mg pro 100 g.

Beim Muskelgewebe werden stark schwankende Werte für Ammoniak angegeben, die doch in der Regel 20—30 mal so hoch wie die Blute normalerweise vorkommenden Mengen sind. Schöndorff gibt in seiner Arbeit an, daß der Harnstoff im Muskelgewebe niedriger als im Blute sei, während Marshall die Angabe macht, daß die Harnstoffkonzentration im Muskel und im Blute gleich sei, da der von ihm gefundene kleine Unterschied seiner Meinung nach auf Analysenfehlern beruht.

Meine Resultate machten es wahrscheinlich, daß es sich um eine Umbildung von Harnstoff in Ammoniak handelt. Um dieses festzustellen, habe ich eine Reihe Versuche unternommen, bei welchen ich teils die Ammoniak- nebst Harnstoffmenge, nachdem ein Muskel zu verschiedenen Zeiten 3—4—5 Stunden hingestanden hat, bestimmte, und teils die Ammoniak- sowie Harnstoffmengen festlegte, nachdem der Muskel unmittelbar nachdem das Tier getötet war, in Alkohol von ÷20° abgekühlt wurde. Auf Grund dieser Erkenntnis habe ich eine Methode zur Bestimmung des Ammoniaks und des Harnstoffs im Gewebe ausgearbeitet, deren Prinzip darin besteht, daß das Versuchstier durch einen Schlag in den Nacken betäubt, und darauf das zu untersuchende Gewebe so schnell und möglich fortdissekiert wie in ein tariertes Wägeglas gebracht wird, das eine im voraus auf — 20° abgekühlte geeignete Menge 96 proz. Alkohol enthält. Das Wägeglas wird dann auf neue gewogen, wobei der Gewichtsunterschied das Gewicht des Gewebes angibt.

In der Regel verwendete ich 3—5 g. Das Gewebe wird darauf so schnell wie möglich mit Sand in einem Mörser zerrieben, der in einer Kältemischung steht, um auch hier eine starke Abkühlung zu erreichen. Die zerriebene Masse wird mit dem Alkohol des Wägeglases übergossen, worauf die Mischung, wenn man nur das Ammoniak bestimmen will, gleich in den Analysenbehälter gebracht wird. Der Mörser wird einige Male mit Wasser ausgespült, worauf ich das Ammoniak wie gewöhnlich bestimmte, indem ich die Luftblasen durch die Flüssigkeit trieb.

Bestimmt man neben dem Ammoniak auch den Harnstoff, verfährt man genau in der gleichen Weise, nur filtriert man die

zerriebene Gewebsmasse ab und wäscht den Niederschlag mit ca. 50 ccm Alkohol aus. Zum Filtrat setzt man ganz wie oben beschrieben 10 ccm einer Lösung von primärem, phosphorsauren Kali (6 bis 1000 g) sowie 10 ccm Wasser.

Die Mischung wird wie beschrieben eingedampft, so daß die Temperatur 25° nicht übersteigt. Wenn die Eindampfung genügend fortgeschritten und noch ca. 20 ccm Flüssigkeit übriggeblieben ist, macht man in üblicher Weise an der einen Hälfte eine Harnstoffbestimmung und an der anderen Hälfte eine Ammoniakbestimmung.

In der untenstehenden Tabelle habe ich einige Analysenresultate angeführt, die zeigen, daß die Harnstoffkonzentration und die Ammoniakkonzentration im Muskelgewebe und im Blute gleich ist.

Die ersten Bestimmungen nahm ich an Muskelgewebe von Hunden vor, wo ich wie oben beschrieben, unmittelbar nach Tötung des Tieres den Muskel ausdissekierte. Die Analysen ergaben das überraschende Resultat, daß im Muskel eine niedrige Harnstoffkonzentration als im Blute, doch anderseits im Muskel eine höhere Ammoniakkonzentration als im Blut vorhanden war, sowie das die Summe von Harnstoff plus Ammoniak im Muskel gleich der Summe von Harnstoff plus Ammoniak im Blute war. Bei Durchsicht der Literatur fand ich, daß überall höhere Werte für Ammoniak im Gewebe als die normalerweise im Blute vorkommenden Mengen angegeben wurden. Die Ammoniakmenge des Blutes ist, wie die Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt haben, sehr klein und ziemlich konstant und beträgt normalerweise von 0,25 bis 0,5 mg per 100 g.

Beim Muskelgewebe werden stark schwankende Werte für Ammoniak angegeben, die doch in der Regel 20—30 mal so hoch wie die im Blute normalerweise vorkommenden Mengen sind. Schöndorff gibt in seiner Arbeit an, daß der Harnstoff im Muskelgewebe niedriger als im Blute sei, während Marshall die Angabe macht, daß die Harnstoffkonzentration im Muskel und im Blute gleich sei, da der von ihm gefundene kleine Unterschied seiner Meinung nach auf Analysefehlern beruht.

Die Tabelle zeigt zugleich, daß beim Stehen des Gewebes eine Steigerung der Ammoniakkonzentration auf Kosten des Harnstoffes stattfindet, so daß die Summe von Harnstoffstickstoff

plus Ammoniakstickstoff konstant ist. Die Zahlengrößen variieren gegenseitig in der Weise, daß der Ammoniakstickstoff ebensoviel steigt, wie der Harnstoffstickstoff innerhalb eines bestimmten Zeitraumes sinkt.

Daß man bei allen früheren Untersuchungen so hohe Werte für Ammoniak im Muskelgewebe fand, beruht darauf, daß beim Eintritt des Todes eine Verwandlung des Harnstoffes im Muskelgewebe in Ammoniak erfolgt, so daß man um so höhere Werte findet, je länger man mit der Harnstoffbestimmung wartet. Wenn man lange genug wartet, wird sich der gesamte Harnstoff in Ammoniak verwandeln, was in der Regel nach Verlauf von 4 bis 5 Stunden durchgeführt sein wird. Umgekehrt findet man natürlich weniger Harnstoff, je länger man mit der Bestimmung wartet. Bestimmt man den Harnstoff erst 4—5 Stunden nach Eintritt des Todes, wird man also das Ergebnis erhalten, daß Muskelgewebe keinen Harnstoff enthält.

Der Ammoniakstickstoff, für den die verschiedenen Forscher Werte angegeben haben, ist in Wirklichkeit Harnstoffstickstoff. Hierdurch erklären sich auch die stark variierenden Werte, die für Ammoniak im Muskelgewebe angegeben werden, da die gefundenen Zahlen ja teils von der Schnelligkeit der Bestimmung und teils von der Harnstoffkonzentration in dem Muskel abhängig sind, an dem die Bestimmung gemacht wurde.

Was die Umwandlung des Harnstoffs in Ammoniak bewirkt, weiß ich nicht, doch hört der Prozeß nicht auf, wenn man wie Iversen[14]) in seiner Arbeit über das Ammoniak und sein Schicksal im Organismus behauptet, Uranylchlorid in schwach salzsaurer Flüssigkeit zusetzt, wogegen der Prozeß meiner Feststellung nach nicht stattfindet, wenn man den Muskel gleich in Alkohol bringt, der bis auf ÷ 20° abgekühlt ist.

Diese Erscheinung muß meiner Ansicht nach ein Beweis dafür sein, daß es Schöndorff nicht gelungen ist, die stickstoffhaltigen Stoffe quantitativ auszufällen, da die Phosphorwolframsäure ja in diesem Falle ebenfalls das Ammoniak ausgefällt haben würde, und Schöndorff hätte dann gefunden, daß das Muskelgewebe keinen Harnstoff oder jedenfalls eine niedrige als die von ihm angegebene Konzentration enthielt. Falls Marshall und Davis ihre Bestimmungen fraktioniert hätten, würden sie also eine relativ höhere Ammoniakkonzentration

und dementsprechend niedrigere Harnstoffkonzentration in Gewebe als im Blute gefunden haben. Da sie dieses aber unterließen, kamen sie zu dem Ergebnis, daß die Harnstoffkonzentration im Gewebe die gleiche wie im Blute sei.

Versuche am Frosch (Muskelgewebe).

Bestimmt nach meiner Methode.

mg pro 100 g Muskel		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	0,8	Ammoniakstickstoff	0,6
Harnstoffstickstoff	9,3	Harnstoffstickstoff	9,6
Summe	10,1	Summe	10,2
2 Stunden später:			
Ammoniakstickstoff	5,0	Ammoniakstickstoff	0,6
Harnstoffstickstoff	5,3	Harnstoffstickstoff	9,6
Summe	10,3	Summe	10,2

Versuche an Ratte (Muskelgewebe).

Nach meiner Methode.

Ammoniakstickstoff	0,6	Ammoniakstickstoff	0,5
Harnstoffstickstoff	10,2	Harnstoffstickstoff	10,7
Summe	10,8	Summe	11,2
4 Stunden später:			
Ammoniakstickstoff	8,4	Ammoniakstickstoff	0,5
Harnstoffstickstoff	2,6	Harnstoffstickstoff	10,7
Summe	11,0	Summe	11,2

Versuche am Hund (Muskelgewebe).

Nach meiner Methode.

Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff	0,3
Harnstoffstickstoff	12,6	Harnstoffstickstoff	12,7
Summe	13,0	Summe	13,0
5 Stunden später:			
Ammoniakstickstoff	12,5	Ammoniakstickstoff	0,3
Harnstoffstickstoff	1,0	Harnstoffstickstoff	12,7
Summe	13,5	Summe	13,0

Außer an Muskeln habe ich noch an anderen Geweben Bestimmungen gemacht, so an der Leber, am Herzen, an der Milz und am Fettgewebe, wo ich ganz in der beim Muskelgewebe beschriebenen Weise verfuhr, indem ich die Gewebe gleich bis auf — 20° abkühlte, da bei diesen sonst ebenfalls eine Verwandlung des Harnstoffs in Ammoniak erfolgen würde.

Leber.

In untenstehender Tabelle führte ich die Ergebnisse meiner an Leber von Hunden vorgenommenen Bestimmungen an. Wie die Tabelle zeigt, ist die gleiche Ammoniak- und Harnstoffkonzentration in der Leber wie im Blute vorhanden.

Versuch I.

mg pro 100 g Leber		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	0,6	Ammoniakstickstoff } . . .	9,4
Harnstoffstickstoff	8,8	Harnstoffstickstoff }	
Summe	9,4	Summe	9,4

Versuch II.

Ammoniakstickstoff	0,8	Ammoniakstickstoff	0,6
Harnstoffstickstoff	20,0	Harnstoffstickstoff	20,5
Summe	20,8	Summe	21,1

Versuch III.

Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff	0,5
Harnstoffstickstoff	10,1	Harnstoffstickstoff	10,4
Summe	10,5	Summe	10,9

Herz.

Wie aus den in untenstehender Tabelle angeführten Resultaten hervorgeht, besteht die gleiche Ammoniak- und Harnstoffkonzentration im Herzen wie im Blute.

Versuch I.

mg pro 100 g Herz		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff } . . .	20,4
Harnstoffstickstoff	20,0	Harnstoffstickstoff }	
Summe	20,4	Summe	20,4

Versuch II.

Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff	0,5
Harnstoffstickstoff	16,3	Harnstoffstickstoff	16,6
Summe	16,7	Summe	17,1

Milz.

An der Milz von Hunden habe ich 2 Bestimmungen gemacht. Ich fand bei beiden die gleiche Harnstoffkonzentration wie im Blute, während ich bei der einen Bestimmung eine höhere Ammoniakkonzentration als im Blute fand. Diese Erscheinung gedenke ich bei einer späteren Gelegenheit einer näheren Untersuchung zu unterwerfen.

In untenstehender Tabelle habe ich die erhaltenen Resultate angeführt.

Versuch I.

mg pro 100 g Milz		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	3,2	Ammoniakstickstoff	0,4
Harnstoffstickstoff	8,8	Harnstoffstickstoff	8,9
Summe	12,0	Summe	9,3

Versuch II.

Ammoniakstickstoff	0,7	Ammoniakstickstoff	0,4
Harnstoffstickstoff	10,2	Harnstoffstickstoff	10,8
Summe	10,9	Summe	11,2

Was Muskeln, Leber, Herz und Milz anbelangt, kam ich also zu dem Ergebnis, daß in diesen Geweben die gleiche Harnstoffkonzentration wie im Blute vorhanden ist.

Um indessen mit Sicherheit entscheiden zu können, ob Gleichgewicht zwischen den in Frage stehenden Organen und dem Blute besteht, ist es erforderlich, den Verteilungskoeffizienten zwischen Ringers Flüssigkeit und Gewebe der erwähnten Organe zu bestimmen. Dieses ist jedoch mit so großen technischen Schwierigkeiten verbunden, daß ich mich nicht darauf eingelassen habe; außerdem wurden einem bei einer solchen Bestimmung sicher so viele Fehler unterlaufen, daß man sich auf den etwaigen gefundenen Verteilungskoeffizienten nicht verlassen könnte.

Die Frage, ob Gleichgewicht besteht oder nicht, bin ich also nicht imstande, für die in Frage stehenden Gewebe mit absoluter Sicherheit zu beantworten; daß ich aber die gleiche Harnstoffkonzentration wie im Blute fand, spricht in hohem Grade dafür, daß tatsächlich Gleichgewicht vorhanden ist.

Fettgewebe.

Die Bestimmungen an Fettgewebe sind teils an Nierenfett und teils an Eingeweidefett gemacht worden.

Wie untenstehende Tabelle zeigt, ist die Harnstoffkonzentration im Fettgewebe niedriger als im Blute. Um zu entscheiden, ob Gleichgewicht vorhanden ist, bestimmte ich den Verteilungskoeffizienten zwischen Ringers Flüssigkeit und verschiedenen Fettstoffen.

Um mit Sicherheit wasserfreien Fettstoff zu erhalten, bestimmte ich zuerst den Verteilungskoeffizienten zwischen Ringers Flüssigkeit und Olivenöl, wo ich in der Weise verfuhr, daß ich das Olivenöl durch Schütteln mit Ringers Flüssigkeit, in der Harnstoff aufgelöst

worden war, emulgierte. Die Harnstoffkonzentration in Ringers Flüssigkeit bestimmte ich zuvor durch Analyse. Durch Zentrifugieren scheidet das Öl sich nach Verlauf von 24 Stunden aus der Ringers Flüssigkeit aus, worauf ich den Harnstoff von neuem in derselben bestimmte. Die Differenz zwischen den beiden Bestimmungen gab darauf die im Öl aufgelöste Harnstoffmenge an.

Aus dem Verhältnis zwischen der Harnstoffkonzentration im Öl per 100 ccm und der Harnstoffkonzentration in Ringers Flüssigkeit per 100 ccm ergab sich der Verteilungskoeffizient 0,07.

Zugleich bestimmte ich den Verteilungskoeffizienten des Harnstoffs zwischen Ringers Flüssigkeit und Schweinefett, das ich im voraus entwässert hatte, indem ich es mit getrocknetem schwefelsauren Natron zusammenschmolz und darauf einige Stunden im Wasserbad stehenließ, wodurch das Wasser entweder verdunstete oder sich mit dem schwefelsauren Natron verband.

Der Verteilungskoeffizient wurde bei 45° bestimmt, indem das Fett zuerst geschmolzen und darauf mit Ringers Flüssigkeit, die eine Harnstofflösung enthielt, emulgiert wurde. Die Emulsion ließ ich bei einer Temperatur von 45° stehen und schied darauf das Fett durch Zentrifugieren aus der Ringers Flüssigkeit aus.

Ich nahm dann eine nochmalige Harnstoffbestimmung an der Ringers Flüssigkeit vor und fand, daß der Verteilungskoeffizient zwischen Schweinefett und Ringers Flüssigkeit ebenfalls 0,07 war. Um entscheiden zu können, ob Gleichgewicht besteht, ist es jedoch erforderlich, zugleich den Wassergehalt des Fettgewebes zu kennen.

Eine Bestimmung, die ich zu diesem Zwecke vornahm, mißlang, doch ist nach den allgemeinen Angaben durchschnittlich 15% Wasser im Fettgewebe enthalten, in welchem Falle kein Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Fettgewebe und im Blute vorhanden sein würde.

In nachfolgender Tabelle habe ich die Bestimmungen angeführt, die ich am Fettgewebe eines Hundes ausführte.

mg pro 100 g Nierenfett		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff	0,5
Harnstoffstickstoff	6,4	Harnstoffstickstoff	20,0
Summe	6,8	Summe	20,5

mg pro 100 g Eingeweidefett		mg pro 100 g Blut	
Ammoniakstickstoff	0,4	Ammoniakstickstoff	11,0
Harnstoffstickstoff	2,7	Harnstoffstickstoff	11,0
Summe	3,1	Summe	11,0

Das Ergebnis meiner Untersuchungen ist, daß der Harnstoff im Organismus nach physikalischen Gesetzen diffundiert, so daß in den Sekreten und im Gewebe nie eine höhere, aber bisweilen eine niedrigere Harnstoffkonzentration als im Blute vorhanden ist.

Eine Ausnahme hiervon bilden Tränen und Schweiß, wo die Drüsen imstande sind, aktiv Harnstoff auszuscheiden, so daß man dort eine höhere Harnstoffkonzentration als im Blute findet.

Wenn man in irgendeinem Sekret eine niedrigere Harnstoffkonzentration findet, so beruht dieses darauf, daß die Sekretion so lebhaft war, daß der Harnstoff mit der Ausscheidung des Wassers nicht gleichen Schritt halten konnte. Um einen Anhalt dafür zu erhalten, mit welcher Schnelligkeit der Harnstoff diffundiert, habe ich einige Versuche angestellt, um die Diffusionskonstante für Harnstoff durch Bindegewebsmembranen und Muskelmembranen zu bestimmen.

Als einstweiliges Ergebnis kann ich mitteilen, daß die Diffusion des Harnstoffs im Vergleich zu Luftarten sehr langsam verläuft.

Die Bestimmungen wurden ad modum A. Krogh[16]) vorgenommen.

Die Frage, inwieweit Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff des Blutes und der verschiedenen Teile des Organismus besteht, ist dahin zu entscheiden, daß mit Ausnahme von Tränen und Schweiß Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff des Blutes und der Sekrete vorhanden ist; ob Gleichgewicht zwischen dem Harnstoff des Blutes und des Gewebes besteht, konnte ich mit Ausnahme vom Fettgewebe nicht entscheiden, da ich wegen technischer Schwierigkeiten nicht imstande bin, den Verteilungskoeffizienten zu bestimmen.

Das Ergebnis meiner Untersuchungen besagt ferner, daß in den von mir untersuchten Organen und Sekreten die gleiche Ammoniakkonzentration wie im Blut vorhanden ist. Eine Ausnahme hiervon bildet die Milz, in der ich in einem Falle eine höhere Ammoniakkonzentration fand, als im Blute normalerweise vorhanden zu sein pflegt.

Zusammenfassung.

1. Der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und Blutkörperchen und zwischen Ringers Flüssigkeit und Blutkörperchen ist bestimmt worden. Der Verteilungskoeffizient ist für beide Flüssigkeiten zwischen 0,72—0,80.

2. Der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und den Sekreten des Organismus ist 1.

3. Der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und Gewebe ist mit Ausnahme des Fettgewebes wegen technischer Schwierigkeiten nicht bestimmt worden.

4. Der Verteilungskoeffizient zwischen Plasma und wasserfreiem Fett ist 0,07.

5. Die Harnstoffkonzentration ist in allen Geweben und im Blut gleich, mit Ausnahme des Fettgewebes. Die Harnstoffkonzentration nimmt in den Sekreten bei lebhafter Sekretion ab.

6. Es besteht mit Ausnahme von Tränen und Schweiß Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Blute und in den verschiedenen Sekreten des Organismus.

7. Ob Gleichgewicht zwischen der Harnstoffkonzentration im Blut und Gewebe besteht, kann nicht mit absoluter Sicherheit beantwortet werden, doch lassen die Analysenresultate das Vorhandensein von Gleichgewicht in hohem Maße als wahrscheinlich erscheinen.

8. Die Ammoniakkonzentration ist im Blute und in den Sekreten und Organen gleich (Milz siehe S. 298).

9. Eine Methode zur Bestimmung des Ammoniaks in organischen Flüssigkeiten und Gewebe wird beschrieben.

Zum Schlusse spreche ich dem Vorsteher des Laboratoriums, Herrn Prof. A. Krogh, meinen herzlichsten Dank für die mir bei dieser Arbeit verschiedentlich geleistete freundliche Hilfe aus.

Literatur.

[1]) Prevost und Dumas, Ann. de Chim. et de Phys. **23**. — [2]) Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **62**. — [3]) Marshall, Jr., und Davis, J., Journ. of Biolog. Chem. **18**. 1914. — [4]) Gad-Andresen, Diese Zeitschr. **99**. — [5]) van Slyke und Cullen, Journ. of Biolog. Chem. **19**. 1914; **24**. 1916. — [6]) Krogh, M., Zeitschr. f. physiolog. Chem. **84**. — [6a]) Gad-Andresen, Journ. of Biolog. Chem. **39**. 1919. — [7]) Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **66**. — [8]) Bang, J., Diese Zeitschr. **72**. — [9]) Scheel, V., Klinische Mitteilungen vom Bispebjerg Hospital. — [10]) Aronssohn, Compt. rend. de la soc. de biol. **71**. 1911. — [11]) Widal, ibid. — [12]) Schöndorff, Arch. f. d. ges. Physiol. **74**. — [13]) Marshall und Davis, Journ. of Biolog. Chem. **18**. 1914. — [14]) Poul Iversen, Ammoniums Forhold in Organismen. Medizinische Doktordissertation, Kopenhagen 1918. — [15]) Krogh, A., Journ. of physiol. **52**, Nr. 6. 1919.

Über die Zerlegung der Brenztraubensäure durch verschiedene Pilze.

Von

T. Nagayama (Tokio).

(*Eingegangen am 3. Februar 1921.*)

Es ist bekannt, daß die Brenztraubensäure außer von Hefen noch durch andere Mikroorganismen gespalten werden kann. Diese Frage hat ein besonderes Interesse dadurch erlangt, daß nach den Untersuchungen von Neuberg mit Nord und Wolff[1]), Cohen[2]) sowie Peterson und Fred[3]) beim Abbau der Zuckerarten und nahe verwandter Substanzen durch Pilze und Bakterien intermediär Acetaldehyd auftritt. Als Vorstufe des Acetaldehyds müssen wir aber die Brenztraubensäure betrachten. Nachdem nun die Entstehung von Acetaldehyd als Stoffwechselprodukt verschiedener Mikroorganismen festgestellt worden ist, war es wichtig, zu untersuchen, wie die Brenztraubensäure und ihre Salze, die Pyruvinate, von solchen Erregern zerlegt werden.

Aus diesem Grunde habe ich die Einwirkung folgender Pilze geprüft:

1. Monilia candida.
2. Oidium lactis.
3. Aspergillus niger mutante.
4. Mucor plumbeus.
5. Mucor rouxii.
6. Mucor racemosus.

Die genannten Mikroorganismen, die äußerst gärkräftig waren, habe ich auf Brenztraubensäure in Anwesenheit von kohlensaurem Kalk kultiviert, in anderen Fällen außerdem bei

---

[1]) C. Neuberg und F. F. Nord, diese Zeitschr. 96, 133. 1919; C. Neuberg, F. F. Nord und E. Wolff, diese Zeitschr. 112, 144. 1920.

[2]) C. Cohen, diese Zeitschr. 112, 139. 1920.

[3]) W. H. Peterson und E. B. Fred, Journ. biol. Chem. 44, 30. 1920.

Gegenwart von Dinatriumsulfit und Calciumsulfit; denn es steht fest, daß die sekundären schwefligsauren Salze die Fähigkeit besitzen, Acetaldehyd zu fixieren[1]).

In der Tat erhielt ich die besten Resultate bei Verwendung von Dinatrium- oder von Calciumsulfit, während ohne diese Aldehyd-abfangmittel die Ausbeuten zumeist geringer gewesen sind.

Die Versuche wurden in nachstehender Art vorgenommen:

A) Ansätze ohne Zugabe von schwefligsaurem Salz.

Die Nährflüssigkeit bestand aus einer Lösung von 18 g Pepton Witte, 30 g saurem Kaliumphosphat und 18 g Magnesiumsulfat in 3 l Wasser. Diese Mischung wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen in bekannter Weise im Kochschen Dampftopf sterilisiert.

Zu den einzelnen Ansätzen dienten jedesmal 100 ccm dieses Substrats, die sich in flachen konischen Kölbchen befanden. Jedes derselben wurde mit 1,5 g bei 180° trocken sterilisiertem Calciumcarbonat sowie mit 1,5 g frisch destillierter wasserfreier Brenztraubensäure versetzt. Wenn nach wiederholtem Durchschütteln und mehrstündigem Stehen die Neutralisation der Brenztraubensäure sicher vollzogen war, wurden die erwähnten Pilze eingeimpft. Die mit Monilia candida und Mucor rouxii beschickten Gefäße wurden bei 37° stehen gelassen, die anderen bei 25°.

Nach dreiwöchiger Digestion erfolgte die quantitative Bestimmung des gebildeten Acetaldehyds nach dem Destillations-Titrationsverfahren von Neuberg und Reinfurth[1]), indem derselbe abdestilliert bzw. freigemacht und im Wasserdampfstrom übergetrieben wurde; dabei wurde die Vorsichtsmaßregel beobachtet, eine etwaige Verflüchtigung unzerlegter Brenztraubensäure durch nochmaligen Zusatz von reichlichen Mengen kohlensauren Kalks (10 g) zu verhindern.

Die mit den einzelnen Erregern erhaltenen Resultate gehen aus folgender tabellarischen Übersicht hervor:

B) Da mit der Möglichkeit zu rechnen war, daß unter dem Einflusse des kohlensauren Kalks der aus der Brenztraubensäure auf biochemischem Wege entstehende Acetaldehyd mehr oder minder weitgehend dismutiert wird, habe ich — wie bereits erwähnt — auch eine

[1]) C. Neuberg und E. Reinfurth, diese Zeitschr. 89, 389. 1918.

Serie unter Zugabe von schwefligsauren Salzen angestellt, wobei also auf eine Festlegung des Aldehyds zu rechnen war.

Die Versuche dieser Reihe sind genau wie bei der Anordnung a) vorgenommen, nur mit dem Unterschiede, daß zu je 100 ccm Nährflüssigkeit außer 1,5 g Brenztraubensäure nebst 1,8 g kohlensaurem Kalk das sterile Sulfit gefügt wurde. Und zwar wurden teils 28 ccm einer 6 proz. Lösung von sekundärem schwefligsauren Natrium hinzugesetzt und durch Zugabe von 72 ccm Wasser Gesamtvolumina von 200 ccm hergestellt; in anderen Fällen verwendete ich 5 g keimfreies festes Calciumsulfit, das rund 50% wasserfreies $CaSO_3$ enthielt. Auch hier wurde das Volumen mit sterilem Wasser stets auf 200 ccm ergänzt.

Die Bestimmung des Acetaldehyds geschah wieder nach der Destillations-Titrationsmethode, und zwar gleichfalls unter Zugabe von reichlich überschüssigem Calciumcarbonat, so daß einerseits die Acetaldehyd-Sulfit-Komplexverbindung sicher zerlegt und andererseits alle unveränderte Brenztraubensäure als nichtflüchtiges Kalksalz zurückgehalten worden ist.

Die erzielten Werte sind aus den Tabellen I u. II ersichtlich:

Tabelle I.

Nr.	Art des Pilzes	Gesamtvolumen des Destillates in ccm	Ausfall der Nitroprussidnatriumprobe	Absol. Menge d. Acetaldehyds in mg	Ausbeute an gebild. Aldehyd in % der Theorie
1	Monilia candida	480	+	180,2	24,02
2	Oidium lactis	395	+	79,9	10,65
3	Asperg. n. mutante	260	+	61,8	8,24
4	Mucor plumbeus	345	+	32,6	4,35
5	Mucor rouxii	345	+ +	71,3	9,51
6	Mucor racemosus	260	+	24,6	3,28

Tabelle II.

Nr.	Art des Pilzes und Zusatzes	Gesamtvolumen des Destillates in ccm	Ausfall der Nitroprussidnatriumprobe	Absolute Menge des Acetaldehyds in mg	Ausbeute an gebildet. Aldehyd in % der Theorie
1	Monilia candida (Na_2SO_3)	340	+ +	258,1	34,41
2	Oidium lactis (Na_2SO_3)	295	+	31,0	4,13
3	Asperg. n. mutante (Na_2SO_3)	375	+ +	79,9	13,86
4	Mucor plumbeus ($CaSO_3$)	320	+	73,2	9,76
5	Mucor rouxii ($CaSO_3$)	410	+ +	221,9	29,58
6	Mucor racemosus ($CaSO_3$)	330	+	55,9	7,45

Im ganzen zeigte sich, daß alle Erreger, aber in verschiedenem Umfange, die Brenztraubensäure zerlegen; bei Gegenwart von Sulfit stieg in der Regel der Ertrag an Acetaldehyd. Aus der Nährlösung ohne Brenztraubensäure entstand in keinem Falle Acetaldehyd. Ob Schädigungen der Mikroorganismen durch die relativ in großen Mengen angewendete Brenztraubensäure einen Einfluß haben, ob die Spaltung der letzteren nur langsam verläuft oder schon in kürzerer Zeit ihr Optimum erreicht, oder ob sekundäre Veränderungen des entstandenen Acetaldehyds im Spiele sind, habe ich noch nicht festgestellt.

Jedenfalls aber lehren meine Versuche, daß die genannten Pilze auf Lösungen von brenztraubensaurem Calcium wachsen und dabei in typischer Weise carboxylatisch wirksam sind. Um die Ergebnisse richtig einzuschätzen, muß man auch in Betracht ziehen, daß selbst Traubenzucker von den genannten Kleinlebewesen keineswegs glatt und zum Teil nur in sehr langen Zeiten umgesetzt wird.

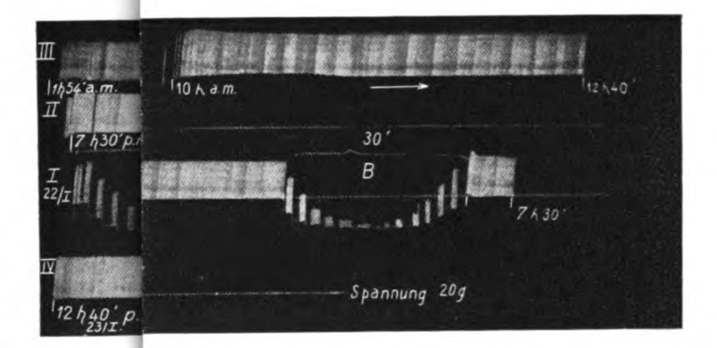
Druckfehlerberichtigung

zu der Mitteilung von C. Neuberg und J. Hirsch „Über ein Kohlenstoffketten knüpfendes Ferment (Carboligase)" diese Zeitschrift Band **115**, Heft 3—6.

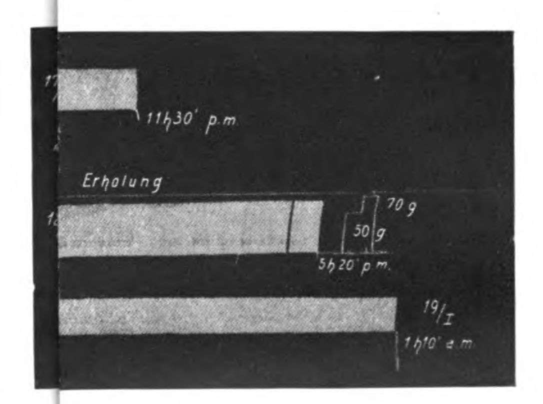
S. 289, Zeile 19 lies: lebender statt ebender.

S. 308, Versuch α. In der dritten Zeile ist einzufügen: „Nach dem Angären wurden 15 ccm Benzaldehyd eingetragen". Das Gemisch wurde . . . . . .

Autorenverzeichnis.

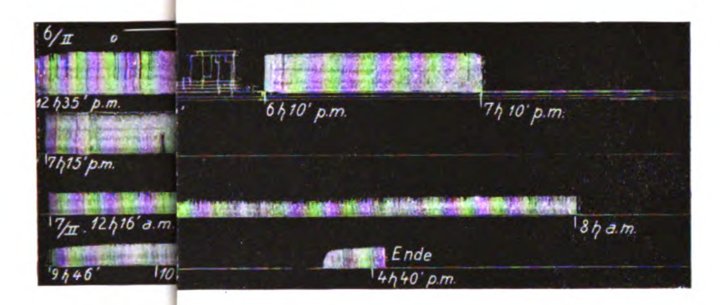


Experiment s Muskels 37,3 mm. Bei A und B Länge-Spannungsdiagramme.

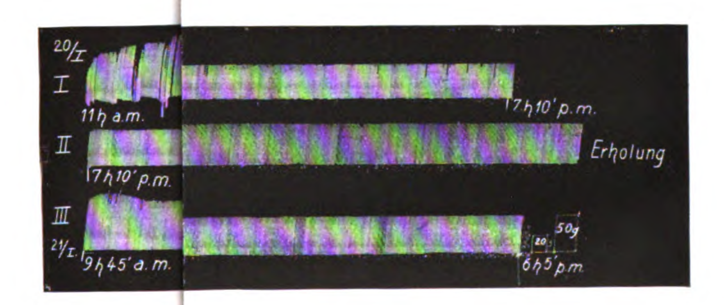


erstoffatmosphäre. Konstante Spannung 20 g.





Versuch 6. II. u 41,5 mm. Belastung 5 g. Spannungszuckung und Spannungs-Längediagramm n III und IV nur halb so groß wie in I und II, obwohl den



Versuc 42 cm. Spannungs-Längediagramme fortgelassen.



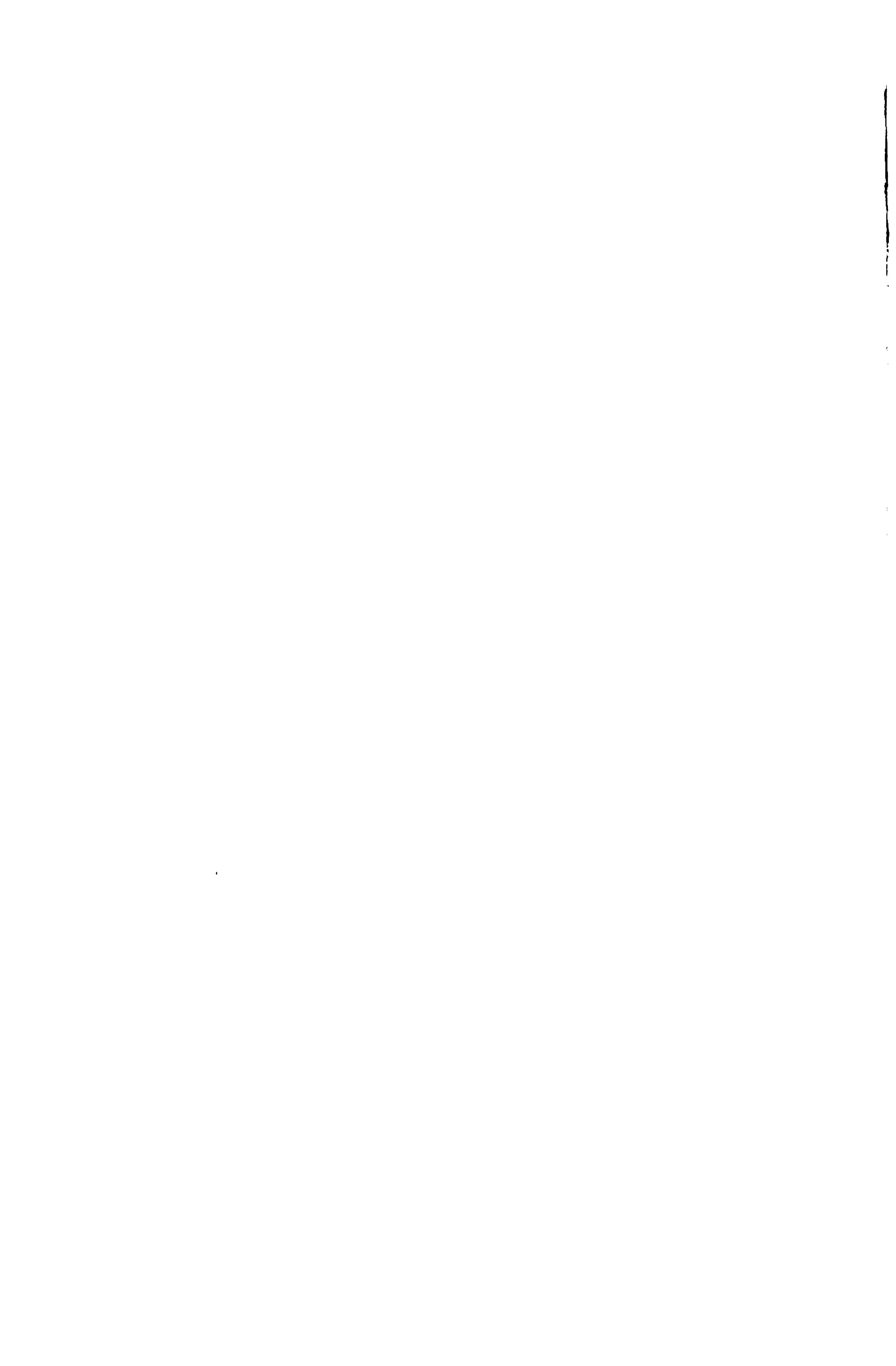
Fortsetzung des Inhaltsverzeichnisses!

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig










STACKS





